

Centre technologique ALPHANOV, Talence  
Laboratoire INSERM Bioingénierie Tissulaire - U 1026, Bordeaux

# **Etude expérimentale de procédés de bioimpression assistés par laser femtoseconde**

Par Hélène DESRUS

Thèse de doctorat Interface Chimie Biologie

Dirigée par	Fabien GUILLEMOT	2013-2015
	Sylvain CATROS	2015-2016
Encadrée par	Florent DELOISON	2013-2015
	Bruno CHASSAGNE	2015-2016

Présentée et soutenue publiquement le 17/05/2016

Devant un jury composé de :

Philippe Delaporte,	Professeur,	Université d'Aix-Marseille,	Rapporteur
Karsten Plamann,	Professeur,	Université de Paris-Saclay,	Rapporteur
Sylvain Catros,	Docteur,	Université de Bordeaux,	Directeur de thèse
Bruno Chassagne,	Ingénieur Docteur,	Alphanov,	Encadrant de thèse
Lionnel Canioni,	Professeur,	Université de Bordeaux,	Président
Frédéric Prima,	Professeur,	Chimie ParisTech,	Jury

« Quand tu es arrivé au sommet de la montagne, continue de grimper. »

*Proverbe tibétain*

# Résumé

Ce mémoire est consacré à l'étude expérimentale de deux procédés de bioimpression assistée par laser femtoseconde, fonctionnant à 1030 nm. En effet, les lasers femtosecondes constituent un choix intéressant pour la bioimpression: la versatilité des matériaux qui peuvent être déposés et la zone affectée thermiquement négligeable sont des atouts pour l'impression de structures biologiques complexes, sans compromettre la viabilité et la fonctionnalité des matériaux biologiques transférés.

Tout d'abord, la bioimpression assistée par laser femtoseconde avec couche absorbante métallique a été étudiée sur une bioimprimante adaptée au transfert de cellules (MODULAB®). Une étude expérimentale a été menée par observation du jet induit par laser grâce à un système d'imagerie résolue en temps (TRI) et par impression sur receveur (puits de culture). La rhéologie de la bioencres, certains paramètres laser, ainsi que la position de focalisation laser ont été variés lors des expériences. Des tests de viabilité cellulaire après l'impression ont permis d'identifier une énergie optimale de 3  $\mu\text{J}$ . L'étude de la variation de la position de focalisation a permis de prédire la plage de tolérance de la position de focalisation du laser : pour une énergie de 3,5  $\mu\text{J}$  et une ON équivalente de 0,125, la tolérance maximale dans la direction « z » était de 60  $\mu\text{m}$  pour pouvoir imprimer.

Dans un second temps, la bioimpression assistée par laser femtoseconde sans couche absorbante a été étudiée sur un montage expérimental comprenant un réservoir de bioencres via des paramètres opératoires clés (position de focalisation, ouverture numérique de l'objectif de focalisation, diamètre de goutte imprimé, la hauteur du jet de l'impression par TRI, la distance de transfert limite pour imprimer). L'impression était reproductible pour une distance d'impression de 75 %  $h_{\text{max}}$  à 100 %  $h_{\text{max}}$ ,  $h_{\text{max}}$  étant la hauteur maximale du jet d'impression pour une condition expérimentale. L'utilisation du réservoir de bioencres a permis de trouver une position de focalisation z tolérante:  $\Delta z$  a été calculée (Zernike et l'aberration sphérique) et mesurée. Expérimentalement,  $\Delta z$  valait de 0 à 60  $\mu\text{m}$  selon la bioencres et l'ON. Elle était maximale à l'ON 0,4. Cette tolérance est grande devant la profondeur de champs dans l'air (4  $\mu\text{m}$  à l'ON 0,4) mais faible au regard de la tolérance sur la position du receveur qui peut subir une variation de 25%  $h_{\text{max}}$ , d'après la plage de reproductibilité.

**Mots-clefs:** LIFT, TRI, Bioimpression par laser, Laser femtoseconde

# Experimental study of bioprinting processes assisted by femtosecond laser

This manuscript deals with the experimental study of two bioprinting processes assisted by femtosecond laser at a wavelength of 1030 nm. Indeed, femtosecond lasers are an interesting choice for bioprinting: the high versatility of materials which can be deposited and the negligible heat affected zone are advantages to print complex biological structures without compromising viability and functionality of the transferred biological materials.

Firstly, femtosecond laser assisted bioprinting with a metallic absorbing layer was studied on a bioprinter adapted for cell printing (MODULAB®). An experimental study was conducted, observing the laser induced jet of liquid with a time-resolved imaging system (TRI) and printing on receiver substrates (cell culture well plate). The bioink rheology, some laser parameters, and the laser focus position were changed during the experiments. Cell viability assays after the printing enabled to identify an optimal energy of 3  $\mu\text{J}$ . The study of the laser focus position variation allowed predicting the tolerance range of the laser focus position: for 3.5  $\mu\text{J}$  and an equivalent numerical aperture (NA) of 0.125, the maximum tolerance in the “z” direction was of 60  $\mu\text{m}$  in order to print.

Secondly, femtosecond laser assisted bioprinting without an absorbing layer was studied on an experimental set-up comprising a reservoir of bioink. Some key operating parameters were studied (focalization position, NA of the focalization objective, printed drop diameter, printing jet height by TRI, maximum transfer distance for printing). The printing was reproducible for a printing distance from 75 %  $h_{\text{max}}$  to 100 %  $h_{\text{max}}$ , with  $h_{\text{max}}$  corresponding to the maximum printing jet height for a given experimental condition. Using the reservoir of bioink enabled to find a tolerant focalization position  $z$ :  $\Delta z$  was calculated (Zernike polynomial and the spherical aberration) and measured. Experimentally,  $\Delta z$  ranged from 0 to 60  $\mu\text{m}$  depending on the bioink and the NA. It was maximal at NA 0.4. This tolerance is high compared to the depth of field in the air (4  $\mu\text{m}$  at NA 0.4) but low compared to the tolerance of the receiver substrate position which can vary to 25 %  $h_{\text{max}}$  according to the reproducibility range.

**Keywords:** LIFT, TRI, laser bioprinting, femtosecond laser



# Remerciements

Je remercie mes directeurs de thèse, Dr. Fabien Guillemot puis Dr. Sylvain Catros, et mes encadrants de thèse, Dr. Florent Deloison puis Dr. Bruno Chassagne, pour m'avoir fait évoluer et guidée lors de ces 3 années.

Je remercie l'ANRT pour le soutien financier du projet de thèse.

Aussi, je tenais à remercier chaleureusement le Centre technologique Alphanov, en particulier son directeur M. Benoit Appert-Collin et le manager de la business unit « Micro-usinage » laser Dr. Rainer Kling, pour m'avoir accueillie, soutenue, financée et fait confiance.

J'exprime ma gratitude au laboratoire INSERM 1026 et à sa directrice Pr. Joëlle Amédée, pour l'accueil au laboratoire de bioingénierie tissulaire.

Je remercie aussi toute l'équipe de la start-up Poietis pour leur aide (merci Catherine !) et m'avoir permis de réaliser des expériences dans leurs locaux.

Je remercie le CRPP et Eric Laurischesse pour les mesures réalisées.

Je remercie le CELIA pour son support, notamment avec un logiciel d'analyse d'images.

Je remercie l'ensemble du personnel d'Alphanov, pour leur soutien tant par la bonne humeur que par leurs conseils (Super Panda tu te reconnaitras, M.A.C., JLO, Marie, Ludo, la MUL team, Marc, Charlilou, GLA, MCH, EVE, LWI, LEL, GMI, Laura, Clémentine, Dora, Batman, Bastien, les stagiaires, Vincent, Francois, Cindy, Marie, ... ; la SYSTEMES team, Adèle, Armand, KRO, Quentin, Guillaume, Emmanuel, Steeve, Simon, Valentin ... ; la LASER team, Pascal, Ramatou, Christophe, Claude, Yohan, ... ).

Je remercie tous les membres du laboratoire, qui m'ont notamment enrichi par leurs disciplines et conseils (Murielle, Manuella, Emeline, Ali, Raphael, Jérôme, Virginie, ...).

Je remercie aussi les « autres » (Mathieu, Caro, Laurence, Paul-Etienne (merci pour la clé usb !!!) ...).

Enfin, je remercie mes amis et ma famille pour son soutien.

# Sommaire

<b>1. Introduction .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. Ingénierie tissulaire et bioimpression .....</b>	<b>15</b>
1.1.1. L'ingénierie tissulaire .....	15
1.1.2. La bioimpression.....	17
<b>1.2. Historique du LIFT .....</b>	<b>23</b>
1.2.1. Premières expériences LIFT.....	23
1.2.2. Méthodes dérivées du LIFT .....	24
1.2.3. Autres applications du LIFT .....	27
<b>1.3. Le LAB ou LIFT pour la bioimpression .....</b>	<b>29</b>
1.3.1. Définition .....	29
1.3.2. Exemples de réalisations.....	30
1.3.3. Intérêts de la bioimpression par la technique LAB .....	31
<b>1.4. Mécanismes généraux impliqués lors du LAB .....</b>	<b>33</b>
1.4.1. Description expérimentale.....	33
1.4.2. Principes physiques généraux du LAB.....	34
<b>1.5. Objectifs de la thèse .....</b>	<b>45</b>
<b>2. Matériels et Méthodes expérimentales .....</b>	<b>55</b>
<b>2.1. Bioimprimante Modulab avec couche absorbante .....</b>	<b>57</b>
2.1.1. Description.....	57
2.1.2. Choix du laser .....	59
2.1.3. Préparation des échantillons.....	60
<b>2.2. Montage de bioimpression par LAB sans couche absorbante .....</b>	<b>65</b>
2.2.1. Description.....	65
2.2.2. Choix du laser .....	67
2.2.3. Adaptation du donneur sous forme de cuve.....	67
2.2.4. Préparation des échantillons.....	68
<b>2.3. Imagerie Résolue en Temps .....</b>	<b>71</b>
2.3.1. L'ombroscopie.....	71
2.3.2. Le montage général du TRI.....	72
2.3.3. Les différents montages expérimentaux.....	77
2.3.4. Calcul des vitesses et accélérations instantanées .....	79
<b>2.4. Caractérisation post-impression .....</b>	<b>81</b>
2.4.1. Bioimpression avec couche absorbante.....	81
2.4.2. Bioimpression sans couche absorbante.....	81
2.4.3. Nombre de répétitions des expériences de bioimpression.....	82
<b>2.5. Caractérisation des bioencres .....</b>	<b>84</b>
2.5.1. Viscosité.....	84
2.5.2. Tension de surface et densité .....	84
2.5.3. Spectres d'absorption.....	85
2.5.4. En résumé .....	85
<b>3. Bioimpression par laser femtoseconde avec couche absorbante .....</b>	<b>87</b>

<b>3.1.</b>	<b>Caractérisation des bioencres .....</b>	<b>89</b>
3.1.1.	Spectres d'absorption .....	89
3.1.2.	Caractéristiques rhéologiques des bioencres .....	90
<b>3.2.</b>	<b>Etude Expérimentale du Mécanisme d'Ejection par analyse Post-Mortem.....</b>	<b>92</b>
3.2.1.	Influence de l'Energie sur les diamètres imprimés .....	92
3.2.2.	Influence de l'Energie sur la viabilité cellulaire .....	94
<b>3.3.</b>	<b>Etude Expérimentale du Mécanisme d'Ejection par Imagerie Résolue en Temps ...</b>	<b>97</b>
3.3.1.	Influence de l'Energie .....	97
3.3.2.	Influence temporelle .....	100
3.3.3.	Influence de la position de focalisation .....	103
<b>3.4.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>108</b>
3.4.1.	Discussion générale .....	108
3.4.2.	En résumé .....	109
<b>4.</b>	<b><i>Bioimpression par laser femtoseconde sans couche absorbante .....</i></b>	<b>113</b>
<b>4.1.</b>	<b>Caractérisation des bioencres.....</b>	<b>115</b>
4.1.1.	Spectres d'absorption.....	115
4.1.2.	Caractéristiques rhéologiques des bioencres.....	116
<b>4.2.</b>	<b>Etude de l'influence de l'Ouverture Numérique .....</b>	<b>118</b>
4.2.1.	Evolution temporelle de la hauteur du jet induit par laser .....	118
4.2.2.	Evolution temporelle des vitesses et accélérations instantanées du jet induit par laser ..	126
4.2.3.	Influence de la distance d'impression et de l'Ouverture Numérique sur les diamètres et volumes imprimés.....	129
4.2.4.	Influence de l'Ouverture Numérique sur $h_{max}$ , sur le diamètre et le volume imprimés.....	134
4.2.5.	Rôle des aberrations sphériques pour les Ouvertures Numériques utilisées.....	143
<b>4.3.</b>	<b>Etude de l'influence de la position de focalisation.....</b>	<b>146</b>
4.3.1.	Description.....	146
4.3.2.	Résultats expérimentaux .....	151
4.3.3.	Discussion .....	152
<b>4.4.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>155</b>
4.4.1.	Discussion générale .....	155
4.4.2.	En résumé .....	156
<b>5.</b>	<b><i>Conclusion et perspectives .....</i></b>	<b>161</b>
	Conclusion .....	162
	Perspectives.....	164
<b>6</b>	<b><i>Annexes.....</i></b>	<b>168</b>
<b>A.</b>	<b>L'alginate .....</b>	<b>170</b>
<b>B.</b>	<b>Générateur de délais .....</b>	<b>171</b>
	Impression avec le procédé sans couche absorbante .....	171
	Imagerie résolue en temps (TRI).....	172
<b>C.</b>	<b>Logiciel de la caméra, Hiris.....</b>	<b>173</b>
	Prise d'images simples par la caméra.....	173
	Prise d'images multiples en Mode Séquence .....	175
<b>D.</b>	<b>Logiciel d'analyse des images TRI.....</b>	<b>177</b>
<b>E.</b>	<b>Polynômes de Zernike.....</b>	<b>179</b>
	Description.....	179
	Quelques polynômes de Zernike avec l'aberration associée .....	180
	Egalité entre la caustique longitudinale et le polynôme de Zernike de l'aberration sphérique Z9 ..	181

<b>7 Publications et communications .....</b>	<b>185</b>
<b>A. En résumé .....</b>	<b>186</b>
Article de journal.....	186
Acte de congrès.....	186
Chapitre d'ouvrage.....	186
Communication orale.....	187
Communication sous forme d'affiche .....	187
<b>B. Communications écrites .....</b>	<b>188</b>

# Table des illustrations

Figure 1 : Schéma de deux approches de l'ingénierie tissulaire utilisant des matrices extra-cellulaires synthétiques pour présenter les facteurs de croissance aux tissus. (a) Facteurs de croissance encapsulés physiquement et pouvant être libérés par la matrice extracellulaire synthétique pour cibler des populations de cellules spécifiques dans le but de diriger la migration cellulaire et la régénération tissulaire. (b) Sinon, les facteurs de croissance peuvent être liés chimiquement au matériau du système, ce qui les rend disponibles à des cellules qui infiltrent le matériau [9].	16
Figure 2 : (a) et (b) Ingénierie tissulaire top-down. (c) ingénierie tissulaire bottom-up (ECM : matrice extracellulaire) [3].	17
Figure 3: Principe de la bioimpression 3D. Le tissu est fabriqué par couches successives d'encre biologique de cellules (rouge) et de matrice extracellulaire (bleu). Dans cet exemple, il s'agit de sphéroïdes déposés sur des biopapiers [14].	18
Figure 4 : Première impression biologique par imprimante jet d'encre. Des protéines de fibronectine ont été imprimées sur substrat de plastique [15].	18
Figure 5 : Impression par jet d'encre. (a) Principe, (b) Imprimante à jet d'encre [18].	19
Figure 6 : Principe de l'imprimante jet d'encre thermique [20].	20
Figure 7 : Principe de l'imprimante de jet d'encre piézoélectrique [20].	20
Figure 8 : Principe de l'écriture directe guidée par laser. (a) Le laser est focalisé faiblement dans une suspension de particules. (b) Le laser est couplé dans une fibre optique creuse et les particules sont transportées via la fibre [26].	22
Figure 9 : Schéma de la première expérience LIFT [27].	23
Figure 10 : Premières impressions de cellules par LIFT (cellules humaines ostéosarcomes) [30].	24
Figure 11 : Schéma de MAPLE DW [39].	25
Figure 12 : Schéma de AFA-LIFT, Bio-LP ou DRL-LIFT extrait de [30].	26
Figure 13 : Schéma de machine d'impression par transfert laser (LTP pour laser transfer printing) pour la production de cellules solaires (source: <a href="http://www.secondmetal.eu/program/">http://www.secondmetal.eu/program/</a> ). Le procédé est développé par BASF et Schmid Technology GmbH.	28
Figure 14 : Schéma de principe du LAB [91].	29
Figure 15 : Images expérimentales de l'évolution temporelle du LIFT ( $t=0$ correspond à l'impulsion laser). L'ouverture numérique de l'objectif de focalisation est de 0,26 et le laser est un laser Infra-Rouge femtoseconde (800 fs). La bioencre est composée de 10% glycerol (v/v) + 15 mg/ml BSA avec une énergie laser de 24 $\mu\text{J}$ . A 2 $\mu\text{s}$ il y a une déformation de la bulle, puis jusqu'à 5 $\mu\text{s}$ la bulle grossit. On observe l'effondrement de la bulle et la formation du jet de 10 $\mu\text{s}$ à 15 $\mu\text{s}$ . De 15 à 30 $\mu\text{s}$ le jet grossit jusqu'à sa rupture en gouttelettes à 30 $\mu\text{s}$ .	33
Figure 16 : Schéma des différents régimes de LAB [91].	34
Figure 17 : Absorption multiphotonique et avalanche d'ionisation (John Lopez, Alphanov).	36
Figure 18 : (a) Illustration du paramètre $\gamma$ pour une bulle de vapeur dans un liquide, située proche de la surface libre. (b) Calculs de l'évolution de la hauteur du jet (sans dimensions) en fonction du temps (sans dimensions) pour différents $\gamma$ [128].	39
Figure 19 : Schéma de la bulle de vapeur et de la surface du liquide pour différentes valeurs de $\gamma$ au même temps d'évolution du jet. Ce temps correspond à l'impact du jet progressant vers le bas, avec la frontière basse de la bulle de vapeur [128].	39
Figure 20 : Schémas et images résolues en temps de la dynamique du jet de liquide liée au comportement de la bulle de cavitation [130].	41
Figure 21 : Schémas de la bulle de vapeur et de la déformation de la surface du liquide au cours du temps, jusqu'à l'impact du jet progressant vers le bas, avec la frontière basse de la bulle de vapeur [128].	41
Figure 22 : Les différents régimes de ruptures d'un jet. Le jet est généré ici par une buse. a) Rupture de Rayleigh. Les diamètres de gouttes sont plus larges que le diamètre du jet. La rupture survient en de nombreux points en aval de la buse. b) Régime de "first wind-induced". Les diamètres de gouttes sont du	

même ordre de grandeur que le diamètre du jet. La rupture survient en de nombreux points en aval de la buse. c) Régime de "second wind-induced". Les tailles de gouttes sont plus petites que le diamètre du jet. La rupture débute à une certaine distance en aval de la buse. d) Régime d'atomisation. Les diamètres de gouttes sont bien plus petits que le diamètre du jet (spray). La rupture débute à la sortie de la buse.	
[136].....	42
Figure 23 : Rapport d'aspect maximum d'un pont de liquide en prenant en compte l'effet de la gravité. Extrait de [140]. Les cercles (o) correspondent aux calculs de Coriell et al [141]. Les points (■) sont les rapports d'aspect maximum de ponts, mesurés expérimentalement par Vizika et al. Pour trois combinaisons différentes de fluides [19]. La ligne verticale en trait plein représente le rapport d'aspect limite $A=\pi$ en l'absence de gravité. ....	44
Figure 24 : Prototype MODULAB. à gauche: photo de la bioimprimante dans la hotte. à droite: schéma de la bioimprimante. Le trajet du laser est symbolisé par des lignes rouges.....	57
Figure 25 : Schéma de la bioimpression avec couche absorbante.....	58
Figure 26 : Schéma du montage expérimental de bioimpression sans couche absorbante et du montage d'imagerie résolue en temps (TRI). PBS: cube polariseur diviseur de faisceau. Encart (a), principales dimensions du substrat donneur. ....	67
Figure 27 : Profil du faisceau laser S PULSE en sortie laser. ....	67
Figure 28 : Principe de l'ombroscopie.....	71
Figure 29 : Montage général du TRI. ....	73
Figure 30 : Vérification de la calibration avec une fibre optique d'épaisseur connue. ....	74
Figure 31 : Signaux gérés par le générateur de délais.....	75
Figure 32 : Mesure de la hauteur du jet.....	76
Figure 33 : Montage de TRI développé pour l'utilisation avec le prototype de bioimpression MODULAB. ....	78
Figure 34 : Géométrie de l'espace disponible pour le TRI dans le prototype MODULAB (gauche). Montage du TRI dans le prototype (droite). ....	78
Figure 35 : Montage de TRI pour la bioimpression sans couche absorbante. Encart (a): donneur. ....	79
Figure 36 : Spectres d'absorbance pour les bioencres de la bioimpression avec couche absorbante.....	89
Figure 37 : Diamètre de goutte imprimé en fonction de l'énergie laser. ....	93
Figure 38 : Test de viabilité Live/Dead, 24 h après l'impression de la bioencre cellulaire D à 2,5 $\mu\text{J}$ ; 3 $\mu\text{J}$ ; 3,5 $\mu\text{J}$ . Sur la colonne de gauche : images en fluorescence avec les cellules vivantes représentées en vert sur les photos et les cellules mortes représentées en rouge. Sur la colonne de droite : images en lumière blanche.....	95
Figure 39 : Imagerie résolue en temps de l'hydrodynamique du jet induit par laser, observé 90 $\mu\text{s}$ après l'impulsion laser, comme une fonction de l'énergie laser. Les résultats sont présentés pour les bioencres sans cellules : A, B et C. ....	98
Figure 40 : Hauteur des jets en fonction de l'Energie, 90 $\mu\text{s}$ après l'impulsion laser, pour les bioencres A, B et C. ....	98
Figure 41 : Imagerie résolue en temps de l'hydrodynamique du jet induit par laser, observée à différents instants après l'impulsion laser (10, 30, 50 and 70 $\mu\text{s}$ ), pour les énergies laser extrêmes de l'expérience précédente : 1,5 $\mu\text{J}$ et 3,5 $\mu\text{J}$ . Les résultats sont présentés pour les bioencres sans cellules : A, B et C. ....	101
Figure 42 : Hauteur des jets en fonction du temps pour les bioencres A, B et C, à 2 énergies laser : 1,5 $\mu\text{J}$ et 3,5 $\mu\text{J}$ . ....	102
Figure 43 : Schéma de la variation de la position de focalisation laser pour la bioimpression avec couche absorbante.....	104
Figure 44 : (a) Fluence calculée sur la couche d'or quand la position de focalisation laser z varie. (b) Formation du jet par imagerie résolue en temps, observé 20 $\mu\text{s}$ après l'impulsion laser, en variant la position de focalisation laser, pour la bioencre A. L'énergie laser était de 3,5 $\mu\text{J}$ et correspondait à une fluence laser focalisée sur la position de référence de 4,5 J.cm <sup>-2</sup> . La position de référence est désignée par « focus reference ».....	105
Figure 45 : Hauteur du jet en fonction de la position de focalisation pour la bioencre A, 20 $\mu\text{s}$ après l'impulsion laser. ....	105
Figure 46 : Spectres d'absorbance pour les bioencres de la bioimpression sans couche absorbante (pour 1 cm d'épaisseur traversée).....	115
Figure 47: I) Images résolues en temps de l'évolution temporelle du jet induit par laser à 10 $\mu\text{J}$ pour la bioencre A et une Ouverture Numérique (ON) de 0,26 à 0,7. II) Hauteur du jet mesurée sur les images de I) en fonction du temps.....	120

Figure 48 : I) Images résolues en temps de l'évolution temporelle du jet induit par laser à 10 $\mu$ J pour la bioencres B et une Ouverture Numérique (ON) de 0,26 à 0,7 (extrait de [11]). II) Hauteur du jet mesurée sur les images de I) en fonction du temps.....	121
Figure 49: I) Images résolues en temps de l'évolution temporelle du jet induit par laser à 10 $\mu$ J pour la bioencres E et une Ouverture Numérique (ON) de 0,26 à 0,7. II) Hauteur du jet mesurée sur les images de I) en fonction du temps.....	122
Figure 50 : Vitesses (I) et accélérations (II) du jet en fonction du temps pour les différentes bioencres à 10 $\mu$ J.....	127
Figure 51 : Pour les bioencres A, B et E à 10 $\mu$ J : I) Diamètre de gouttes imprimées en fonction de la distance donneur-receveur. II) Volume de gouttes imprimées en fonction de la distance donneur-receveur. La distance donneur-receveur a été variée en fonction du pourcentage de la hauteur maximale ( $h_{max}$ ) correspondant à une condition expérimentale.....	130
Figure 52 : Influence de l'Ouverture Numérique (ON) sur le jet de la bioimpression pour une énergie laser de 10 $\mu$ J. La hauteur maximale du jet $h_{max}$ est donnée en fonction de l'ON pour les bioencres A, B et E (extrait de [11]). .....	135
Figure 53 : Images résolues en temps du jet induit par laser à l'instant du jet de hauteur maximale ( $h_{max}$ ) à 10 $\mu$ J pour les bioencres A, B et E et avec une Ouverture Numérique (ON) de 0,26 à 0,7 (extrait de [11]). .....	135
Figure 54 : Pour une énergie de 10 $\mu$ J et une distance donneur-receveur de $h_{max}$ : I) Diamètres des gouttes imprimées en fonction de l'Ouverture Numérique (ON) et de la bioencres (données extraites de [12]). II) Volumes des gouttes imprimées en fonction de l'Ouverture Numérique (ON) et de la bioencres. ....	137
Figure 55 : Vue de dessus sous microscope des gouttes imprimées en fonction de l'Ouverture Numérique (ON) et de la bioencres pour une énergie laser de 10 $\mu$ J et une distance donneur-receveur de $h_{max}$ (données extraites de [11]). .....	137
Figure 56 : Images résolues en temps du jet à l'instant d'impression avec un receveur en haut de l'image. Les images sont présentées en fonction de l'Ouverture Numérique (ON) et de la bioencres pour une énergie laser de 10 $\mu$ J et une distance donneur-receveur de $h_{max}$ (données extraites de [11]). .....	138
Figure 57 : Energie radiale encerclée, incidente sur la surface libre de la bioencres pour chaque Ouverture Numérique (ON), illustrant l'effet de l'aberration sphérique sur le faisceau due au substrat donneur (verre et bioencres). Les rayons contenant 84% de l'intensité lumineuse diffractée sont donnés par les flèches verticales (extrait de [11]). .....	144
Figure 58 : Images résolues en temps du jet induit par laser lors de la variation de la position de focalisation laser pour la bioencres A et une Ouverture Numérique (ON) de 0,26 à 0,7 (données extraites de [12]). Les images sont prises 30 $\mu$ s après l'arrivée de l'impulsion laser, à 8 $\mu$ J et entre 2 images successives la position de l'objectif de focalisation varie de 10 $\mu$ m. ....	147
Figure 59 : Images résolues en temps du jet induit par laser lors de la variation de la position de focalisation laser pour la bioencres B et une Ouverture Numérique (ON) de 0,26 à 0,7. Les images sont prises 30 $\mu$ s après l'arrivée de l'impulsion laser, à 8 $\mu$ J et entre 2 images successives la position de l'objectif de focalisation varie de 10 $\mu$ m. ....	148
Figure 60 : Images résolues en temps du jet induit par laser lors de la variation de la position de focalisation laser pour la bioencres E et une Ouverture Numérique (ON) de 0,26 à 0,7. Les images sont prises 30 $\mu$ s après l'arrivée de l'impulsion laser, à 8 $\mu$ J et entre 2 images successives la position de l'objectif de focalisation varie de 10 $\mu$ m. ....	149
Figure 61 : Influence expérimentale de la position de focalisation laser longitudinale pour les bioencres A, B et E. Les hauteurs de jet sont mesurées 30 $\mu$ s après l'arrivée de l'impulsion laser pour une énergie de 8 $\mu$ J.....	150
Figure 62 : Tolérance sur la position de l'objectif de microscope pour obtenir un jet de hauteur minimale de 75% $h_{max}$ pour les bioencres A, B, E et une Ouverture Numérique variant de 0,26 à 0,7. ....	151
Figure 63 : Zoom de la propagation finale du faisceau à l'ON 0,4 illustrant l'aberration sphérique. ....	153
Figure 64 : Illustration de la caustique longitudinale ou profondeur de champs équivalente due à l'aberration sphérique. ....	154
Figure 65 : Jet d'un train de 2 impulsions laser (appelé « mode burst » laser). Conditions expérimentales : bioencres A ; 30 $\mu$ m d'épaisseur de bioencres ; 6 $\mu$ J ; 1,4 ps de durée d'impulsion ; 200 kHz. ....	165
Figure 66: Capillaire dans le volume d'hydrogels obtenu par laser femtoseconde .....	166
Figure 67: Unité de base de l'acide alginique.....	170
Figure 68 : Façade du générateur de délais DG645.....	171

<i>Figure 69 : Principaux écran du logiciel Hiris contrôlant la prise d'images de la caméra. ....</i>	<i>173</i>
<i>Figure 70 : Principaux réglages du logiciel Hiris. ....</i>	<i>174</i>
<i>Figure 71 : Fenêtre « Acquisition settings » du logiciel Hiris de la caméra. ....</i>	<i>175</i>
<i>Figure 72 : Logiciel d'analyse des images TRI. ....</i>	<i>177</i>
<i>Figure 73 : Schéma de rayons marginaux et paraxiaux focalisés par une lentille dans un milieu avec de l'aberration sphérique. FM : foyer des rayons marginaux. FP : foyer des rayons paraxiaux. I : caustique longitudinale de l'aberration sphérique. ....</i>	<i>182</i>



# Table des tableaux

<i>Tableau 2-1 : Composition des bioencres pour la bioimpression avec couche absorbante.....</i>	<i>60</i>
<i>Tableau 2-2 : Composition de la bioencre cellulaire.....</i>	<i>61</i>
<i>Tableau 2-3 : Propriétés optiques de l'or à 1030 nm.....</i>	<i>62</i>
<i>Tableau 2-4 : Caractéristiques des objectifs de microscope utilisés. ....</i>	<i>66</i>
<i>Tableau 2-5 : Composition des bioencres pour la bioimpression sans couche absorbante.....</i>	<i>69</i>
<i>Tableau 2-6 : Calculs d'échelle pour les images TRI en fonction du zoom ajustable de la caméra.....</i>	<i>73</i>
<i>Tableau 2-7 : Nombre de répétitions des expériences de TRI. Bioimpression avec couche absorbante. ...</i>	<i>76</i>
<i>Tableau 2-8 : Nombre de répétitions des expériences de TRI. Bioimpression sans couche absorbante. ...</i>	<i>77</i>
<i>Tableau 2-9 : Nombre de répétitions des expériences de bioimpression réalisées avec couche absorbante. ....</i>	<i>83</i>
<i>Tableau 2-10 : Nombre de répétitions des expériences de bioimpression réalisées sans couche absorbante.....</i>	<i>83</i>
<i>Tableau 2-11 : Composition des bioencres pour les deux procédés de bioimpression.....</i>	<i>85</i>
<i>Tableau 3-1 : Absorbance (unités arbitraires, pour 1 cm d'épaisseur traversée) des bioencres à 1030 nm, la longueur d'onde laser. ....</i>	<i>90</i>
<i>Tableau 3-2 : Composition et propriétés physiques (à 20°C) des bioencres pour la bioimpression avec couche absorbante.....</i>	<i>91</i>
<i>Tableau 3-3 : Schéma des viscosités et tensions de surface des bioencres sans cellules pour la bioimpression avec couche absorbante. Les notations de viscosités <math>\mu</math> et tensions de surfaces <math>\sigma</math> sont identiques pour plusieurs bioencres lorsque les valeurs de ces paramètres sont proches ou égales. ....</i>	<i>100</i>
<i>Tableau 4-1 : Absorbance (unités arbitraires pour 1 cm d'épaisseur traversée) des bioencres à 1030 nm, la longueur d'onde laser. ....</i>	<i>116</i>
<i>Tableau 4-2 : Composition et propriétés physiques (à 20°C) des bioencres pour la bioimpression sans couche absorbante.....</i>	<i>117</i>
<i>Tableau 4-3 : <math>h_{max}</math> pour les différentes bioencres et Ouvertures Numériques à 10 <math>\mu</math>J (données extraites de [11,12]). ....</i>	<i>123</i>
<i>Tableau 4-4 : Temps où <math>h_{max}</math> est atteint pour les différentes bioencres et Ouvertures Numériques à 10 <math>\mu</math>J. ....</i>	<i>123</i>
<i>Tableau 4-5 : Gammes de vitesses et d'accélération selon l'ON. Les valeurs négatives sont représentées par la descente du jet (vitesse) et par la baisse de la vitesse (accélération). ....</i>	<i>128</i>
<i>Tableau 4-6 : Distance donneur-receveur utilisée pour les différentes bioencres et Ouvertures Numériques à 10 <math>\mu</math>J. La distance donneur-receveur a été déterminée à partir des valeurs de <math>h_{max}</math> en arrondissant à la dizaine de microns la plus proche.....</i>	<i>138</i>
<i>Tableau 4-7 : Rayon d'Airy et profondeur de champs dans l'air en fonction de l'ON. ....</i>	<i>140</i>

# 1. Introduction

*Ce premier chapitre introduit le contexte général de la thèse. Ainsi, le domaine de l'ingénierie tissulaire et le principe de la bioimpression seront définis. Un inventaire des principales technologies utilisées pour la bioimpression sera réalisé. Deuxièmement, la technique LIFT, à l'origine des procédés d'impression traités dans la thèse, sera présentée via un historique. Des méthodes spécifiques dérivées du LIFT pour la bioimpression seront notamment abordées. Dans une troisième partie, le principe, les avantages et les limites de la bioimpression assistée par laser (LAB) seront expliqués. Les mécanismes généraux impliqués lors des deux procédés de bioimpression avec et sans couche absorbante seront résumés dans une quatrième partie. Enfin, les objectifs de la thèse seront exposés.*

<b>1. Introduction .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. Ingénierie tissulaire et bioimpression .....</b>	<b>15</b>
1.1.1. L'ingénierie tissulaire .....	15
1.1.2. La bioimpression .....	17
<b>1.2. Historique du LIFT .....</b>	<b>23</b>
1.2.1. Premières expériences LIFT .....	23
1.2.2. Méthodes dérivées du LIFT.....	24
1.2.3. Autres applications du LIFT.....	27
<b>1.3. Le LAB ou LIFT pour la bioimpression .....</b>	<b>29</b>
1.3.1. Définition.....	29
1.3.2. Exemples de réalisations .....	30
1.3.3. Intérêts de la bioimpression par la technique LAB.....	31
<b>1.4. Mécanismes généraux impliqués lors du LAB .....</b>	<b>33</b>
1.4.1. Description expérimentale .....	33
1.4.2. Principes physiques généraux du LAB .....	34
<b>1.5. Objectifs de la thèse.....</b>	<b>45</b>

## 1.1. Ingénierie tissulaire et bioimpression

---

### 1.1.1. L'ingénierie tissulaire

#### 1.1.1.1. Définition

L'ingénierie tissulaire a été définie comme « l'ensemble des techniques et des méthodes inspirées des principes des sciences de la vie et de l'ingénierie pour développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus ou de tout un organe [1,2] et la production de construction réalistes pour des applications in vitro [3] ». Ce domaine interdisciplinaire, regroupant la médecine, la biologie et l'ingénierie, ouvre des perspectives pour la réparation et la fabrication de tissus ou même d'organes [4]. Aussi, les tissus créés peuvent être utilisés comme modèles d'étude pour la biologie ou la recherche thérapeutique [5,6]. L'ingénierie tissulaire vise à recréer le micro-environnement spécifique au tissu avec des cellules, une matrice et des facteurs de croissance (cf. Figure 1).

Les tissus biologiques sont composés de différents types cellulaires, intégrés dans une matrice extracellulaire spécifique dotés d'un système de vascularisation. Un organe est une structure complexe composée d'un ensemble de tissus. Par exemple, l'épiderme est un tissu de type « épithélial » constitutif de l'organe de la peau (nb. : le tissu épithélial recouvre les surfaces intérieures ou extérieures du corps avec des cellules placées de façon jointives les unes par rapport aux autres).

L'ingénierie tissulaire conventionnelle, appelée « top-down », implique l'ensemencement de cellules dans une matrice tridimensionnelle, puis la manipulation de cette matrice, à l'aide de bioréacteurs ou chimiquement, en utilisant des facteurs de croissance afin d'influencer les propriétés mécaniques et biologiques du tissu créé. La matrice est constituée d'un matériau poreux biocompatible qui peut être naturel ou synthétique, ou être un organe décellularisé [7,8]. Une autre approche de l'assemblage de cellules et de biomatériaux, dite « bottom-up », « repose sur l'assemblage de blocs de construction imitant les fonctions natives dans des constructions tissulaires plus larges, en utilisant l'empilement de couches, des éléments de garnissage et l'impression 3D » [3]. Les deux approches de l'ingénierie tissulaire sont représentées Figure 2.

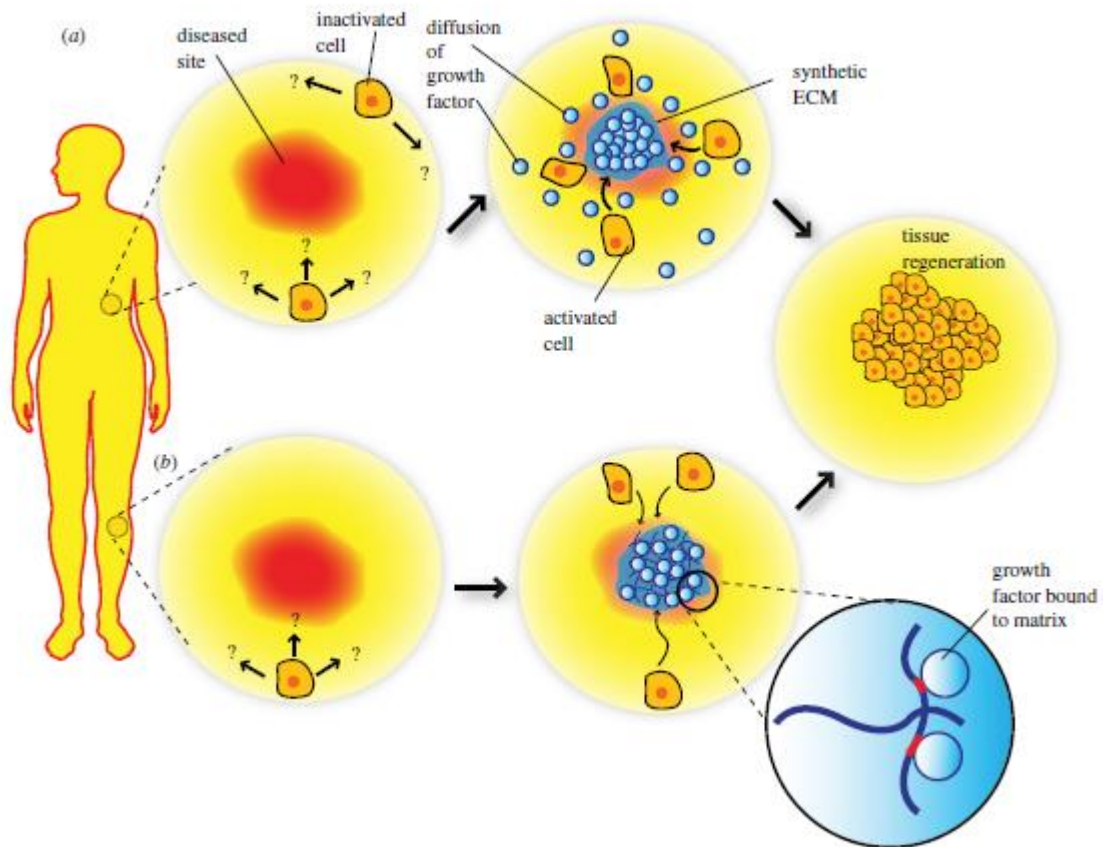


Figure 1 : Schéma de deux approches de l'ingénierie tissulaire utilisant des matrices extra-cellulaires synthétiques pour présenter les facteurs de croissance aux tissus. (a) Facteurs de croissance encapsulés physiquement et pouvant être libérés par la matrice extracellulaire synthétique pour cibler des populations de cellules spécifiques dans le but de diriger la migration cellulaire et la régénération tissulaire. (b) Sinon, les facteurs de croissance peuvent être liés chimiquement au matériau du système, ce qui les rend disponibles à des cellules qui infiltrent le matériau [9].

L'ingénierie tissulaire « top-down » a notamment permis lors des vingt dernières années de progresser sur la régénération de tissus fins ou avasculaires, comme la peau, le cartilage, la vessie, et sur la réparation de tissus avec un haut degré de cicatrisation et de remodelage comme l'os [10]. Cependant, elle peut présenter des limitations car la colonisation des cellules dans la matrice reste difficile à contrôler [7,8]. L'ingénierie « bottom-up » imite mieux la biologie native de certains organes qui ont des « modules » ou « briques élémentaires » répétitifs comme le foie [11,12] et c'est à ce type d'ingénierie que l'on va s'intéresser par la suite via la bioimpression.

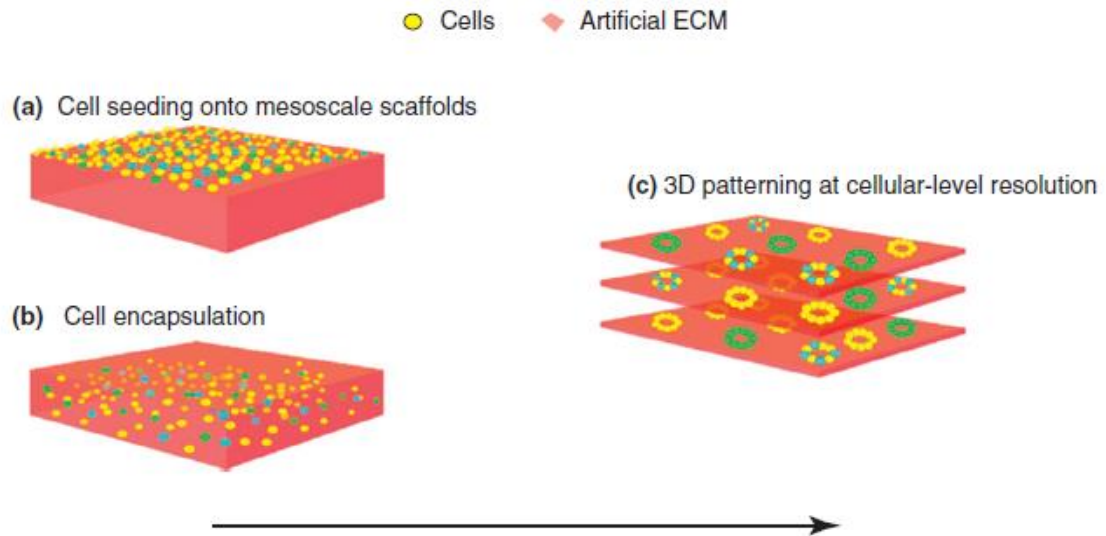


Figure 2 : (a) et (b) Ingénierie tissulaire top-down. (c) ingénierie tissulaire bottom-up (ECM : matrice extracellulaire) [3].

## 1.1.2. La bioimpression

### 1.1.2.1. Définition

Les technologies de bioimpression peuvent être définies comme « l'utilisation de procédés de transfert assistés par ordinateur pour la modélisation et l'assemblage de matériaux vivants et non-vivants avec une organisation prescrite 2D ou 3D dans le but de produire des structures de bioingénierie servant en médecine régénérative, en pharmacologie et pour des études de biologie cellulaire » [13].

La bioimpression se démarque des autres approches d'ingénierie tissulaire par son approche « bottom-up », ou de l'organisation du tissu de la cellule jusqu'à l'organe entier par une fabrication couche par couche.

Son principe est d'organiser avec une haute précision les éléments individuels du tissu pendant sa fabrication via le dépôt couche après couche de cellules et de biomatériaux (cf. Figure 3). Elle permet de reproduire des tissus en 3D avec une géométrie spécifique. L'approche « bottom-up » est compatible avec une automatisation du procédé de fabrication du tissu et peut fonctionner dans un environnement stérile. De plus, l'automatisation pourrait permettre de réduire les coûts, d'améliorer la qualité et la reproductibilité de la fabrication de tissus biologiques.

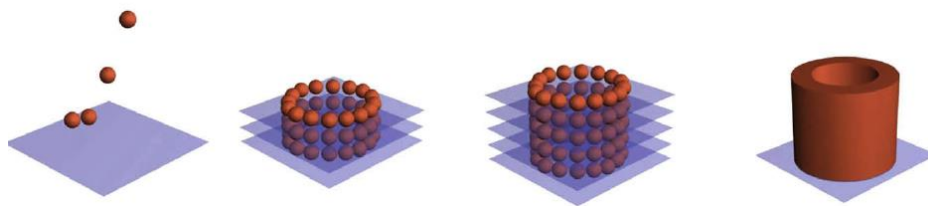


Figure 3: Principe de la bioimpression 3D. Le tissu est fabriqué par couches successives d'encre biologique de cellules (rouge) et de matrice extracellulaire (bleu). Dans cet exemple, il s'agit de sphéroïdes déposés sur des biopapiers [14].

Les techniques de bioimpression regroupent les technologies de dépôt par jet d'encre, les méthodes d'extrusion par micro-seringues, et les méthodes de dépôt assistées par laser.

### 1.1.2.2. Différentes techniques de bioimpression

#### Technologies de jet d'encre

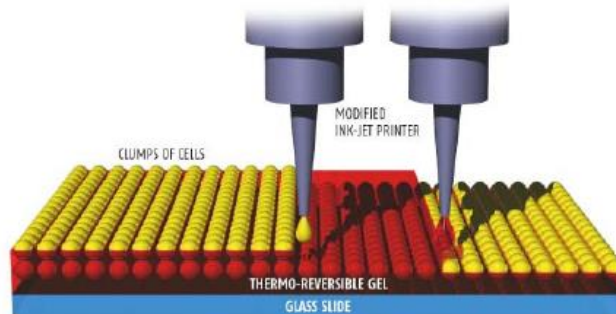
Klebe *et al.* [15] imprimèrent pour la première fois des éléments biologiques par imprimante jet d'encre en 1988. Des protéines de fibronectine, présentes dans la matrice extra-cellulaire furent imprimées et ont permis notamment l'adhésion des cellules sur cette matrice (Figure 4). L'imprimante utilisée était une imprimante commerciale Hewlett Packard modifiée. La résolution atteinte était de 500  $\mu\text{m}$ , soit une dizaine de fois la taille d'une cellule [16].



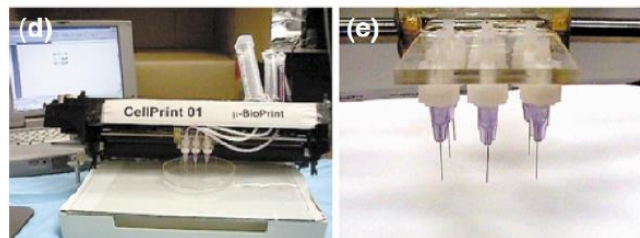
Figure 4 : Première impression biologique par imprimante jet d'encre. Des protéines de fibronectine ont été imprimées sur substrat de plastique [15].

Par la suite dans les années 2000, des imprimantes de bureau modifiées ont permis l'impression d'éléments biologiques [17]. Les têtes d'impression furent modifiées et l'encre des cartouches est devenue une encre contenant des cellules (cf.

Figure 5). Puis, des prototypes d'imprimantes dédiées à l'impression biologique par jet d'encre ont été développés.



(a) Principe de l'impression jet d'encre



(b) Dispositif expérimental de l'impression jet d'encre

Figure 5 : Impression par jet d'encre. (a) Principe, (b) Imprimante à jet d'encre [18].

Des cellules vivantes furent déposées à l'aide de deux types d'imprimantes à jet d'encre : les imprimantes thermiques et les imprimantes piézoélectriques [18–21]. Les deux types d'imprimantes se composent d'une buse d'impression, d'une cartouche d'encre et d'un substrat receveur. L'ensemble du dispositif est contrôlé par ordinateur.

Les imprimantes thermiques sont basées sur l'utilisation d'une cellule thermique qui permet l'éjection de gouttes via une buse de 30  $\mu\text{m}$  à 200  $\mu\text{m}$  de diamètre (cf. Figure 6). Une impulsion thermique de quelques millisecondes entraîne la formation d'une poche de vapeur qui va entraîner l'éjection de gouttes par pression.

Les imprimantes piézoélectriques utilisent un cristal piézo-électrique (cf. Figure 7). Une tension appliquée à ce cristal entraîne une déformation mécanique qui va contracter le réservoir d'encre. Ceci permet l'éjection de gouttelettes d'encre. Lorsque la tension n'est plus appliquée, le réservoir revient en position initiale et se remplit automatiquement par aspiration de l'encre contenue dans le réservoir.



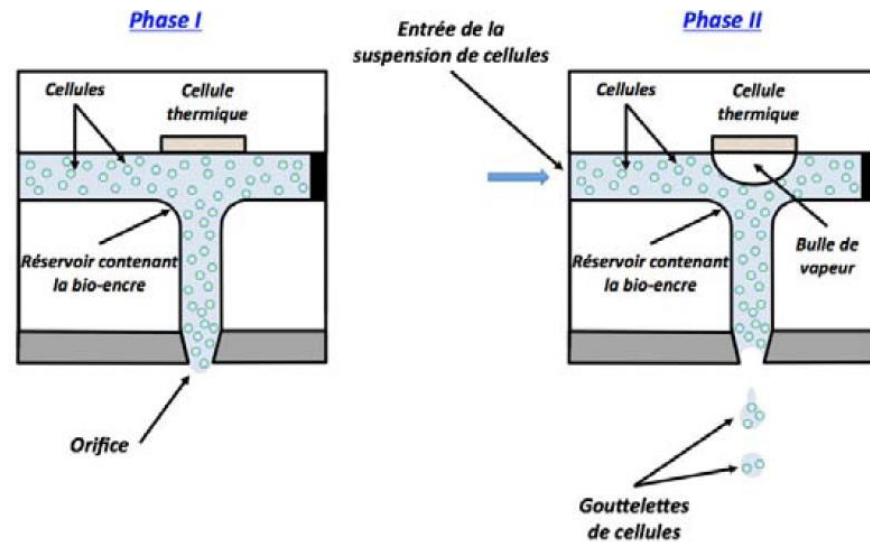


Figure 6 : Principe de l'imprimante jet d'encre thermique [20].

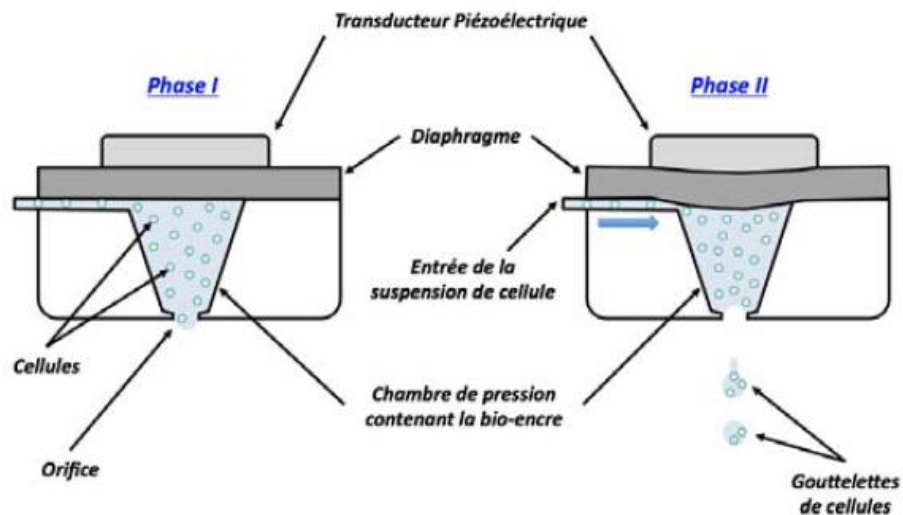


Figure 7 : Principe de l'imprimante de jet d'encre piézoélectrique [20].

Les limites de ces technologies sont, d'une part, la faible concentration cellulaire imprimable ( $<5 \times 10^6$  cellules/ml pour prévenir l'obstruction des têtes d'impression [3]), et d'autre part, l'effet des contraintes de cisaillement sur les cellules à plusieurs étapes de l'impression (i.e. passage dans la tête d'impression, formation et éjection de la goutte, impact de la goutte sur le substrat, remplissage de la tête d'impression).

### Technique d'extrusion par micro-seringues

Des micro-seringues peuvent être aussi employées pour imprimer des éléments biologiques. Cette technique permet d'extruder des filaments continus de biomatériaux

grâce à un système assisté par la pression. Par exemple, le système Bioplotter® comporte une seringue, de débit régulé par système pneumatique, permettant d'imprimer un hydrogel combiné ou non à des cellules. Le système comporte 3 axes de translation pour réaliser un motif en 3D. Il existe de nombreuses variantes de ces bioimprimantes développées pour les hydrogels [22] ou les polymères [23]. Pour construire une matrice en polymère, ces dispositifs sont capables d'imprimer des matériaux de viscosités allant jusqu'à 400 cp [22].

Cependant, pour l'impression de cellules cette technique présente les mêmes limites que l'impression jet d'encre: c'est une méthode de contact ; à forte concentration cellulaire ce type de méthode implique des contraintes de cisaillement importantes pour les cellules passant par la micro-seringue, ce qui peut entraîner une baisse de la viabilité [24] ; la micro-seringue peut s'obstruer pour des concentrations cellulaires peu élevées ( $> 5.10^6$  cellules/ml [19]) ; la résolution est plus faible que pour des techniques laser (de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$  à 100  $\mu\text{m}$  ; <http://3dprintinggel.com/>). L'avantage principal de la technique par extrusion par rapport aux techniques laser est un volume imprimé plus important, de l'ordre du nanolitre/seconde [25].

## **Dépôt assisté par laser**

### **LASER-GUIDED DIRECT WRITING (ECRITURE DIRECTE GUIDEE PAR LASER)**

Cette technique, utilisée pour la première fois en 1999 par Odde *et al.* [26], est basée sur la pression de radiation laser pour diriger le dépôt de particules avec une résolution micrométrique. Elle a été utilisée pour déposer des cellules embryonnaires de la moelle épinière, guidées par les forces laser jusqu'à l'intérieur d'une fibre, puis expulsées une à une de la fibre grâce à l'étroitesse de la fibre (cf. Figure 8). Ces systèmes sont composés d'une diode laser réglable en longueur d'onde et focalisée par une lentille de faible ouverture numérique dans une chambre en verre. Aussi, ils permettent de déposer des particules à de larges distances, de l'ordre de 7 mm.

Cependant, la méthode est limitée en termes de débit de cellules (2.5 cellules/min). On pourrait augmenter ce débit via l'utilisation d'un laser plus puissant avec une densité cellulaire plus importante dans la solution. Mais ceci pourrait conduire à des problèmes d'obstruction de la fibre (densité cellulaire plus forte) et à l'augmentation des dommages cellulaires (intensité laser et vitesses plus importantes).

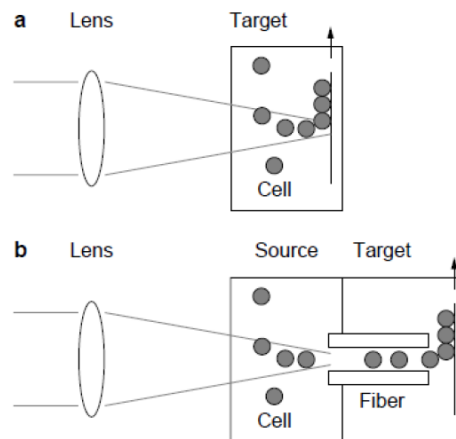


Figure 8 : Principe de l'écriture directe guidée par laser. (a) Le laser est focalisé faiblement dans une suspension de particules. (b) Le laser est couplé dans une fibre optique creuse et les particules sont transportées via la fibre [26].

### TECHNIQUES LIFT MODIFIEES

Une technique d'impression, appelée LIFT pour Transfert vers l'avant induit par laser (Laser induced forward transfer) a été adaptée et aussi utilisée en bioimpression. Cette technique repose sur l'interaction d'une impulsion laser, directe ou indirecte, avec la matière, placée sur un substrat donneur, que l'on veut transférer sur un autre substrat receveur.

Nous allons nous intéresser plus en détail à ces techniques de LIFT dans les paragraphes suivants.

## 1.2. Historique du LIFT

---

### 1.2.1. Premières expériences LIFT

Les premières expériences utilisant le LIFT (« Laser-Induced Forward Transfer » ou « Transfer vers l'avant induit par laser ») furent réalisées par Bohandy *et al.* dans les années 80 [27,28] pour déposer du cuivre et de l'argent sur du silicium ou du verre de silice avec des lasers à excimère ou des lasers Nd:YAG. L'impulsion laser était focalisée sur un substrat donneur recouvert du métal d'intérêt et induisant l'évaporation de la couche métallique. Puis, le matériau était recondensé sur un substrat receveur. Le LIFT fut d'abord utilisé pour transférer des métaux [27] puis il fut étendu aux dépôts d'oxydes [29].

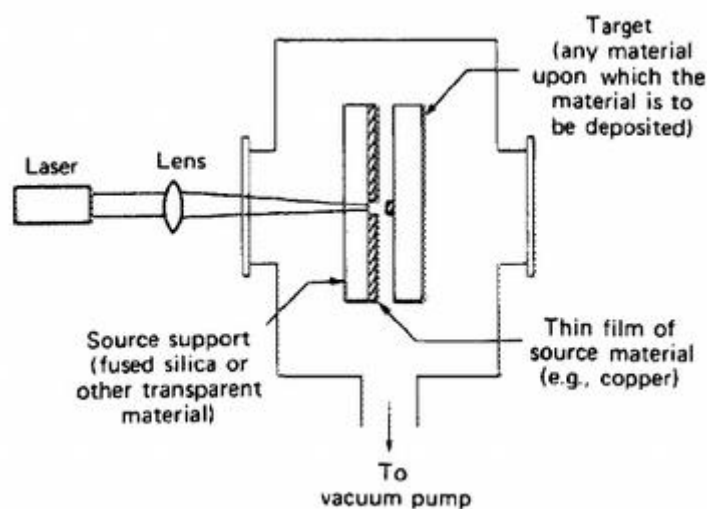


Figure 9 : Schéma de la première expérience LIFT [27].

Dans les années 2000, le LIFT a été adapté pour imprimer des protéines [30], de l'ADN [31,32], des hydrogels [33], et des cellules [34–42]. Ainsi, la première impression de biomatériaux par LIFT date de 2001 [43] et consistait en l'impression de protéines d'insuline, des hormones importantes notamment dans la régulation du taux de glucose sanguin, et en l'impression de protéines de peroxydase de raifort (HRP), une enzyme très utilisée pour détecter des molécules spécifiques, par exemple dans le cas de recherche de protéines du virus du SIDA. Quant au premier transfert de cellules, il date

de 2004 avec notamment le dépôt de cellules de lignée humaine d'ostéosarcome (MG63), des cellules de tumeur osseuse courante [30], le dépôt de cellules de carcinome, des cellules cancéreuses de peau ou de muqueuse [38], ou encore des cellules cardiaques de rat [39].



Figure 10 : Premières impressions de cellules par LIFT (cellules humaines ostéosarcomes) [30].

### 1.2.2. Méthodes dérivées du LIFT

Suite aux premières expériences employant le LIFT, plusieurs méthodes ont émergé, parmi lesquelles le MAPLE DW (« Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation Direct-Writing » pour « Ecriture directe par évaporation laser pulsée assistée par matrice ») et le procédé AFA-LIFT (« Absorbing Film-Assisted Laser-Induced Forward Transfer » pour Absorbing Film-Assisted – LIFT).

#### 1.2.2.1. MAPLE et MAPLE DW

Le MAPLE DW [44,45] a été développé à partir du LIFT et du MAPLE en 1999 par Pique *et al.* [46].

Le MAPLE est un procédé inspiré par la méthode PLD (“Pulsed Laser Deposition” pour “Ablation laser pulsée”) [47] et permet de déposer des films minces de molécules (notamment des matériaux organiques ou polymères) qui ne peuvent être traités par PLD. Le MAPLE consiste à déposer un matériau qui a été mélangé ou dissout

en particules dans une matrice de solvant. La solution est déposée sur un substrat ou congelée (pour contrer la volatilité du solvant) et forme ainsi une cible. Puis, la matrice est évaporée par plusieurs impulsions laser et libère la solution à imprimer. L'énergie libérée par l'évaporation de la matrice propulse le matériau vers un substrat receveur. Au final, le matériau donneur est imprimé comme une fine couche sur le substrat receveur.

MAPLE-DW est une variante du MAPLE avec les propriétés d'écriture directe du LIFT. Cette technique est basée sur l'utilisation d'une matrice sur le substrat donneur qui catalyse l'absorption de l'énergie laser et son transfert [38,48,49]. La matrice est mélangée de façon homogène au matériau donneur pour former une solution. Cette solution est déposée en fine couche sur le donneur. Puis, un laser impulsif est focalisé à travers le substrat pour évaporer la matrice et transférer le matériau donneur sur un substrat receveur faisant face au donneur. L'absorption de l'énergie laser par la matrice photosensible est au cœur du phénomène de transfert. Le MAPLE-DW permet l'impression de métaux [50], de matériaux organiques [44] et de biomatériaux [51], parmi lesquelles enzymes, protéines, cellules et tissus [52]. Pour l'impression de cellules, la matrice peut être du milieu de culture ou une surface adhérente comme un hydrogel ou de la matrice extra-cellulaire [35,38]. Cette méthode a pour inconvénient majeur de soumettre directement les matériaux à imprimer à l'absorption de l'énergie laser par la matrice. Elle est donc peu adaptée au transfert de bioencres sensibles, qui peuvent être altérées sous l'irradiation laser.

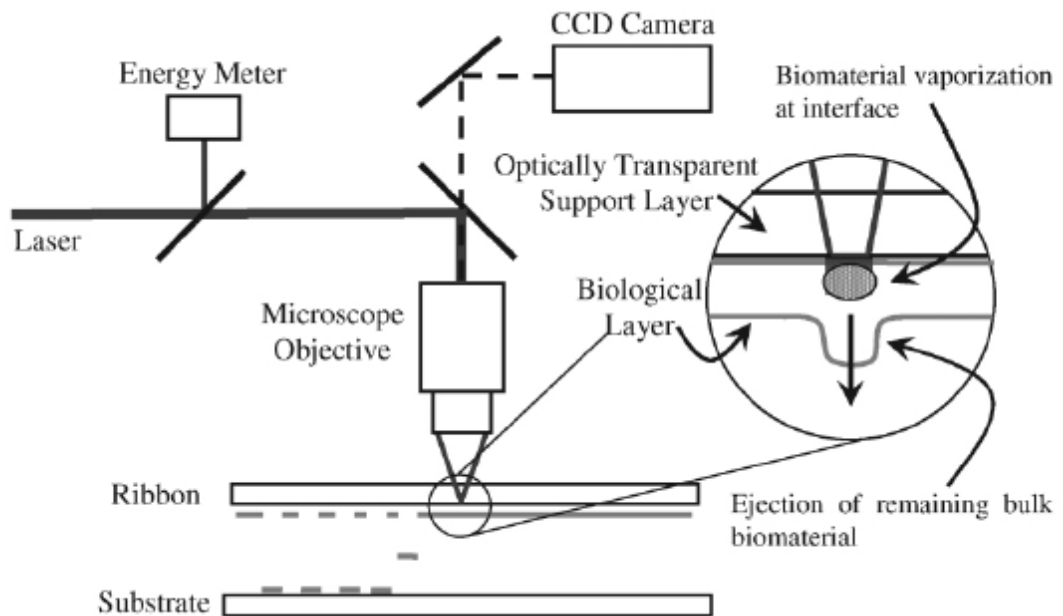


Figure 11 : Schéma de MAPLE DW [39].

### 1.2.2.2. AFA-LIFT, Bio-LP ou DRL-LIFT

Le nom AFA-LIFT a été donné par Hopp *et al.* en 2005 [53] et il désigne la même technique que le Bio-LP ("Biological Laser Printing" ou « Impression biologique par laser ») [30] ou DRL-LIFT ("Dynamic Release Layer LIFT" pour « Libération dynamique de couche LIFT ») [54]. Le but de cette technique est d'éviter l'exposition directe au laser du matériau donneur, grâce à une couche absorbante et de rendre la conversion d'énergie plus efficace en limitant les variations d'une impulsion à l'autre. Dans la méthode AFA-LIFT, la couche absorbante est habituellement une fine couche métallique d'environ 50 à 100 nm déposée sur le substrat donneur par évaporation sous vide. On retrouve notamment de l'or [55,56], du titane [57], de l'argent [58], ou encore de l'oxyde métallique dioxyde de titane [59]. Les métaux [27], céramiques [60], polymères [61], biomolécules [31] sous forme liquide de peuvent être transférés avec l'AFA-LIFT. Cependant, la contamination du matériau déposé par des résidus de la couche absorbante peut être observée si la couche absorbante n'est pas complètement évaporée par le procédé [58].

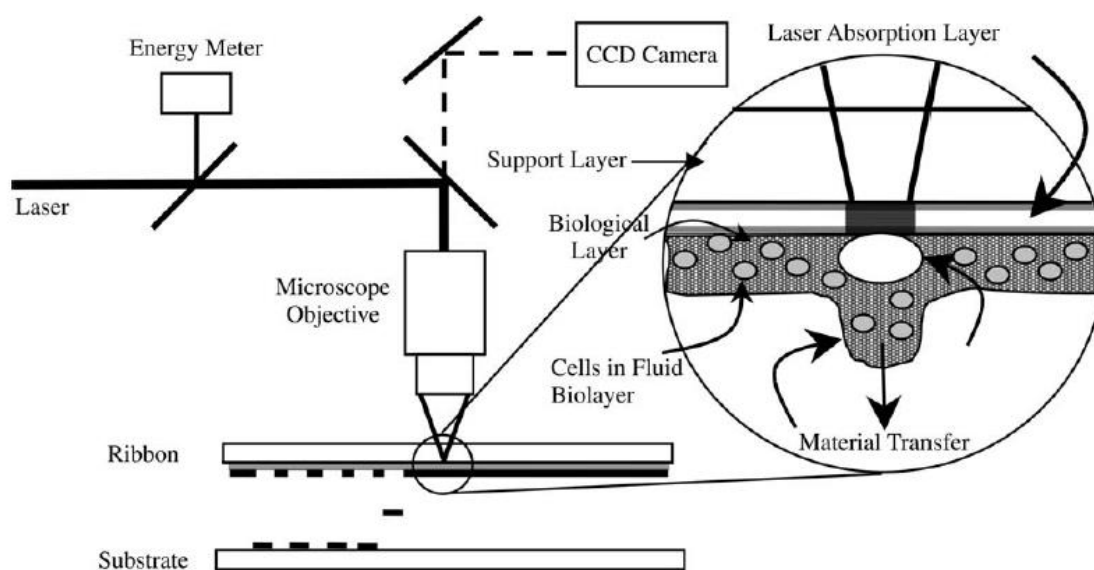


Figure 12 : Schéma de AFA-LIFT, Bio-LP ou DRL-LIFT extrait de [30].

Pour limiter ce problème de contamination, une couche de polymère triazène, sensible au rayonnement UV, a été utilisée en tant que couche absorbante avec des lasers UV dans un montage expérimental AFA-LIFT [62–64]. Il a été montré que l'ablation laser de cette couche de polymère limitait la contamination en particules sur le substrat receveur. Cependant, à cause de la faible température de décomposition du polymère triazène, il y a un nombre limité de matériaux donneurs qui peuvent être

utilisés avec cette couche absorbante [65]. Une couche absorbante de polymère polyimide [57] a aussi été employée en AFA-LIFT. Le mécanisme de transfert est déclenché par la déformation de la couche absorbante qui permet de préserver de tout dommage des encres fragiles lors de l'impression [57,66].

Pour imprimer des biomatériaux, une couche absorbante métallique a été largement utilisée [31,53,67] et Doraiswamy *et al.* [40] ont démontré le dépôt de biomatériaux avec une couche de triazène.

### 1.2.3. Autres applications du LIFT

Le LIFT est donc présent dans une large gamme d'applications allant de la microélectronique [68–70], l'organique électronique [62,71], la fabrication de capteurs ou biocapteurs [72–74], à l'ingénierie tissulaire [3,4,75,76].

Le LIFT s'est notamment développé pour des applications d'interconnexions de structures conductrices dans l'industrie électronique. Même si l'impression par imprimante à jet d'encre est largement employée, les limitations en termes de résolution et de basse viscosité transférables font du LIFT une technologie intéressante pour ce domaine d'application. Ainsi, le LIFT a permis l'impression de lignes conductrices de nanoparticules d'argent [77,78]. Aussi, en optoélectronique, des nanoparticules d'ITO, formant des couches transparentes conductrices ont été imprimées avec des dimensions de 20  $\mu\text{m}$  et des conductivités de 4000  $\Omega^{-1}\text{m}^{-1}$  [79].

La fabrication de capteurs est une application prometteuse du LIFT à court terme. La méthode d'écriture directe est utilisée pour déposer des couches de matériaux lors de la fabrication des détecteurs. Les avantages du LIFT pour cette application sont : l'absence d'utilisation de solvants pour la fabrication, la possibilité de déposer une large gamme de matériaux différents, la haute résolution, la possibilité de déposer des matériaux sur presque tous les types de substrat. L'un des désavantages du LIFT pour la microélectronique, la production de débris métalliques lors du transfert, n'est pas un obstacle pour le développement de capteurs [80]. La fabrication de capteurs de gaz a été démontrée pour le contrôle de la qualité de l'air et pour quantifier le niveau de composants organiques volatiles [81]. Des films minces de  $\text{SnO}_2$  ont été imprimés sur des électrodes et les détecteurs créés étaient 4 fois plus précis que les capteurs commerciaux produits par technique de jet d'encre.

Aussi, le LIFT est déjà utilisé dans l'industrie. Dès 1993, le premier brevet sur « l'impression laser thermique » [82] mentionne le principe du transfert d'encres par un laser. Une couche de conversion de l'énergie absorbe l'énergie laser résultant en



l'éjection de l'encre par mécanismes thermiques. D'autres développements ont donné lieu à des brevets, par exemple sur l'impression thermique par lasers à colorants [83]. L'entreprise Kodak améliora le procédé en permettant l'impression à rouleaux avec la possibilité d'imprimer 4 encres consécutivement [84]. L'entreprise Aurentum GmbH, qui commercialise notamment des imprimantes de transfert par laser, possède aussi des brevets sur l'impression laser et les machines d'impression par méthodes LIFT [85–87]. BASF, un grand groupe de chimie, détient des brevets [85,88] pour inscrire des encres métalliques sur des connections électriques pour fabriquer, par exemple, des cellules solaires photoélectriques. Le substrat donneur est recouvert d'encre grâce à un procédé continu en utilisant une station « encreuse ». Le donneur est déplacé circulairement, ainsi l'encre inutilisée est recyclée. De plus, la station « encreuse » contrôle la viscosité de l'encre et peut remplacer le solvant évaporé si nécessaire (cf. Figure 13).

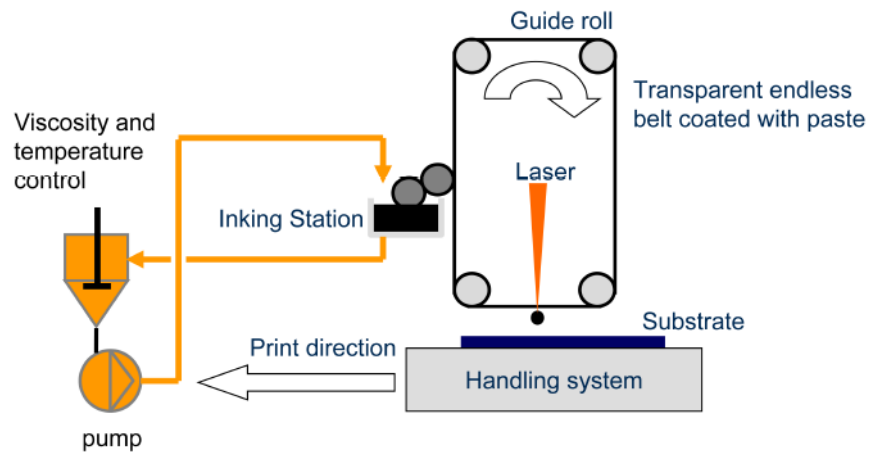


Figure 13 : Schéma de machine d'impression par transfert laser (LTP pour laser transfer printing) pour la production de cellules solaires (source: <http://www.secondmetal.eu/program/>). Le procédé est développé par BASF et Schmid Technology GmbH.

## 1.3. Le LAB ou LIFT pour la bioimpression

### 1.3.1. Définition

Le LIFT est une technique originellement utilisée pour des applications en microélectronique [79,89,90]. Il consiste à transférer un élément de matière depuis un substrat vers un autre substrat grâce à une impulsion laser.

Le LIFT orienté vers des applications de bioimpression a été adapté avec le but de construire en 3D des structures biologiques voire des organes et donc a été appelé LAB (Laser assisted bioprinting ou Bioimpression assistée par laser) [42]. Ainsi, le LAB est entendu comme l'ensemble des méthodes de bioimpression basées sur le LIFT [42] et vise à transférer des éléments biologiques ou biocompatibles. Le LAB est aussi souvent appelé BioLP (Biological laser printing pour Impression laser biologique) [30].

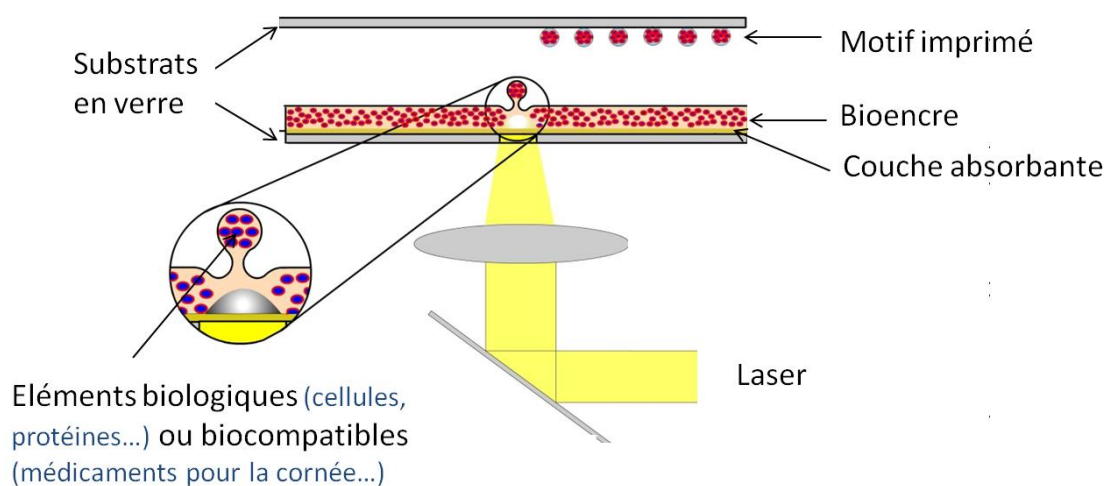


Figure 14 : Schéma de principe du LAB [91].

Avec un montage expérimental de LAB, l'élément de matière transféré est sous forme liquide et est appelé bioencre. Il comprend trois principaux éléments [92]: un laser impulsif, un donneur sur lequel est placé le matériau biologique et sur lequel le laser va agir, et un receveur qui reçoit le matériau biologique imprimé (cf. Figure 14). Aussi, il existe différentes variantes du procédé : le transfert peut être orienté du bas

vers le haut ou du haut vers le bas, il peut ou non comporter une couche absorbante sur le substrat donneur.

L'intérêt du transfert orienté du bas vers le haut est de minimiser la vitesse du biomatériau lors du transfert, et donc le choc du biomatériau pendant l'impact avec le substrat. C'est cette configuration qui a été utilisée ici.

Les impulsions laser sont focalisées, soit sur la couche absorbante, soit dans la bioencres, lorsque le procédé ne comporte pas de couche absorbante. Dans les deux cas, les impulsions laser transfèrent vers l'avant une petite fraction de bioencres.

### 1.3.2. Exemples de réalisations

Le LAB a notamment permis l'impression *in vivo* de nano-hydroxylapatite, principale composante minérale de l'os, pour réparer des défauts dans le crâne de souris [93]. Il s'agissait de la première application de bioimpression dans le but de réaliser des interventions médicales assistées par ordinateur.

Le potentiel du LAB a aussi été démontré en ingénierie tissulaire *in vitro* avec l'étude de motifs cellulaires pour diverses applications : l'étude de la genèse des tumeurs, la sélection de médicaments contre le cancer, des études de différenciation de cellules, l'analyse d'interaction entre cellules, entre cellule et médicament ou encore entre cellule et biomatériaux [94,95].

Le LAB a aussi été utilisé pour imprimer des biomatériaux selon certains motifs avant l'impression de cellules sur ces motifs pour créer des niches de cellules souches [96]. Le but de futures études pourrait être d'organiser plusieurs éléments comme les cellules, un biomatériau jouant le rôle de matrice extra-cellulaire (*i.e.* molécules extracellulaires sur lesquelles reposent les cellules dans la majorité des tissus humains et d'une large partie des tissus animaux) et des facteurs de croissance (vitamines, protéines ...) à différentes échelles pour analyser le comportement de différentes combinaisons d'assemblage [44,48,51]. La fabrication de ces structures en 3D pourrait trouver des applications en médecine régénérative.

Les protéines peuvent être imprimées par LAB sous forme de matrice de spots de protéines. Elles sont essentielles pour les cellules. Par exemple, les protéines de membranes cellulaires sont des composants cellulaires majeurs, jouant des rôles fondamentaux dans les fonctions de la cellule (migration cellulaire, adhésion cellulaire...). Ainsi, des gouttes de protéines membranaires ont été imprimées par Serra *et al.* sur substrat de verre [97]. Ces impressions furent réalisées pour évaluer l'effet de

la technique de transfert sur l'intégrité et la réactivité de la protéine. Aussi, ces matrices de spots d'ADN ou de protéines constituent un outil puissant en biologie. Elles peuvent être utilisées par exemple pour détecter des variations dans la séquence d'une protéine et pourraient être utilisées dans le diagnostic, l'évaluation, et le développement de médicaments [98].

Le LAB seul ne semble pas approprié à la construction 3D de tissus, impliquant de larges volumes, puisque le volume de goutte imprimé est faible, de l'ordre du picolitre [99]. Cependant, l'utilisation du LAB combinée à certains matériaux comme les hydrogels et les « biopapiers », pouvant fournir un important volume dans une approche de fabrication couche par couche, constitue une solution pour la fabrication 3D de tissus. Les hydrogels sont des matériaux polymères biocompatibles de flexibilité similaire à celle des tissus naturels et les biopapiers sont des couches minces de quelques centaines de microns de biomatériau solide insérées entre des couches successives de cellules imprimées. Ainsi, Othon *et al.* ont imprimé des lignes de cellules olfactives sur une matrice d'hydrogel multicouche [100] tandis que Catros *et al.* ont imprimé par LAB des cellules d'ostéosarcome MG63 sur des biopapiers afin de réaliser une construction 3D avec une approche multicouches *in vitro* et *in vivo* [101].

### 1.3.3. Intérêts de la bioimpression par la technique LAB

Le LAB comporte plusieurs avantages, notamment pour la construction de tissus complexes. La versatilité du procédé permet d'imprimer de très nombreux types cellulaires, comme des cellules humaines endothéliales [42], des cellules humaines d'ostéosarcome [30], des cellules de carcinome [38], ou encore des cellules cardiaques de rat [39]. De plus, le procédé permet d'imprimer aussi bien des matériaux inorganiques qu'organiques avec une résolution micrométrique [42].

L'utilisation de la couche sacrificielle absorbante permet de minimiser l'interaction directe de l'impulsion laser avec le matériau à transférer, en absorbant l'énergie de l'impulsion [102]. Ceci est particulièrement intéressant dans le cas du transfert de cellules [66]. En effet, les cellules sont ainsi mieux préservées des effets délétères lors du transfert d'énergie. De plus, la couche sacrificielle voit son intérêt accru dans le cas d'impulsions nanosecondes, où les impulsions sont suffisamment longues pour diffuser de la thermique dans un volume non restreint (la zone affectée

thermiquement est non négligeable contrairement aux impulsions femtosecondes [103]).

Cependant, l'utilisation d'une couche absorbante métallique peut conduire au dépôt de particules provenant de cette couche dans le matériau transféré [58]. Ces particules, de taille nanométriques à micrométriques peuvent s'avérer cytotoxiques pour les cellules [104].

Les impulsions laser femtosecondes peuvent être employées avec le LAB sans couche absorbante du fait de leur brièveté. De plus, elles ont un effet thermique très limité comparé aux impulsions nanosecondes. Ce type d'impulsion laser pourrait donc constituer une solution intéressante pour la bioimpression.

## 1.4. Mécanismes généraux impliqués lors du LAB

---

Le procédé LAB sera abordé, dans un premier temps, à travers une description expérimentale. Puis, les principaux mécanismes mis en jeu lors du procédé LAB seront expliqués grâce à un état de l'art.

### 1.4.1. Description expérimentale

#### 1.4.1.1. Evolution temporelle du LAB en régime de jet

L'évolution temporelle du procédé LIFT peut être observée via un système de TRI (« Time-Resolved Imaging » pour « Imagerie résolue en temps ») (Figure 15). Plusieurs étapes peuvent être identifiées. Au début du procédé, la surface du liquide est déformée par une bosse, qui grossit au cours du temps. Puis, la déformation s'effondre sur elle-même et un jet de liquide est formé. Plus tard, le jet grandit et s'étrécit jusqu'à ce qu'il se rompe en de multiples gouttelettes.

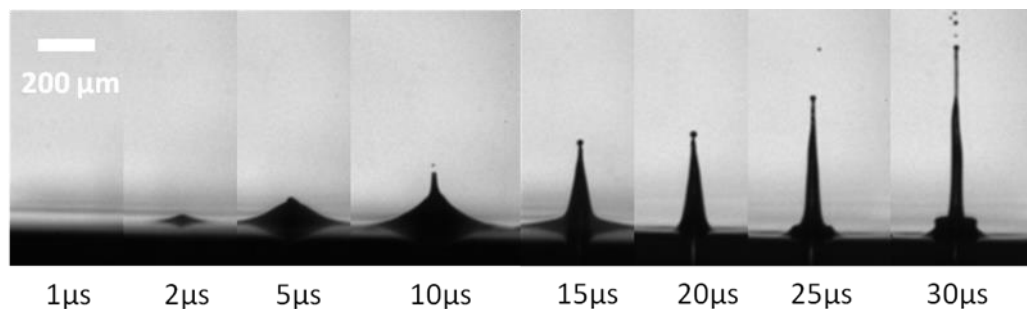


Figure 15 : Images expérimentales de l'évolution temporelle du LIFT ( $t=0$  correspond à l'impulsion laser). L'ouverture numérique de l'objectif de focalisation est de 0,26 et le laser est un laser Infra-Rouge femtoseconde (800 fs). La bioencres est composée de 10% glycerol (v/v) + 15 mg/ml BSA avec une énergie laser de 24  $\mu$ J. A 2  $\mu$ s il y a une déformation de la bulle, puis jusqu'à 5  $\mu$ s la bulle grossit. On observe l'effondrement de la bulle et la formation du jet de 10  $\mu$ s à 15  $\mu$ s. De 15 à 30  $\mu$ s le jet grossit jusqu'à sa rupture en gouttelettes à 30  $\mu$ s.

### 1.4.1.2. Description des régimes du LAB

Trois différents régimes peuvent être identifiés, dépendant de l'énergie laser et de la viscosité de la bioencres [76,105] (Figure 16). Dans le régime de sous-seuil, il y a seulement une déformation de la surface et aucun jet n'est formé. Ce régime est rencontré pour de faibles énergies, de hautes viscosités et une grande épaisseur de bioencres. Dans le régime de jet, le jet est bien défini jusqu'à ce qu'il se rompe en gouttelettes. Ce régime peut être observé pour des valeurs intermédiaires d'énergie, de viscosités et d'épaisseur de bioencres. Dans le régime de panache, un panache de liquide explose. Ce régime peut être observé quand une impulsion de haute énergie, une faible viscosité de bioencres et une faible épaisseur de bioencres sont utilisées.

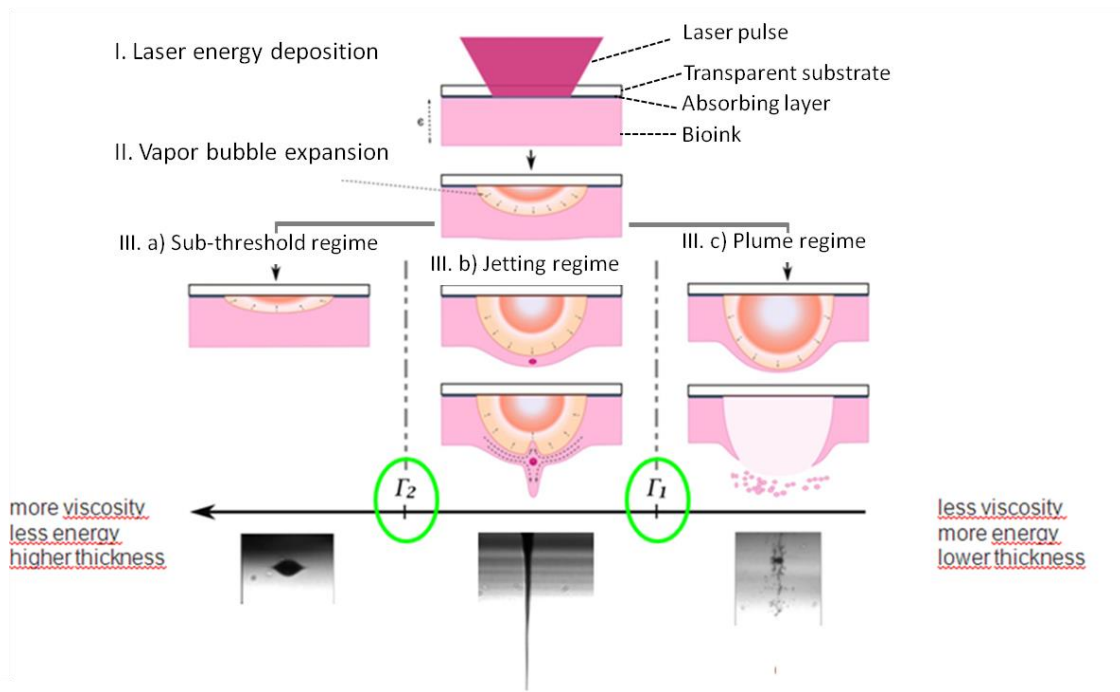


Figure 16 : Schéma des différents régimes de LAB [91].

### 1.4.2. Principes physiques généraux du LAB

Les principes physiques généraux impliqués dans le LAB, avec et sans couche absorbante, regroupent des processus d'absorption de l'énergie laser, de formation et de dynamique de la bulle de cavitation, de formation puis de rupture du jet de liquide.

### **1.4.2.1. Absorption de l'énergie laser pour le LAB femtoseconde avec et sans couche absorbante**

L'impulsion laser est absorbée localement dans la bioencore, menant à la formation d'une bulle de gaz, appelée bulle de cavitation. La formation de la bulle résulte d'un phénomène appelé « optical breakdown » ou rupture optique. Si l'énergie absorbée est supérieure à ce seuil de rupture optique de la bioencore, un plasma absorbant peut être généré et conduira à la formation de la bulle de cavitation [106,107]. Ainsi, la rupture optique, aussi appelée rupture induite par laser, est définie comme le dépassement d'un seuil critique de densité d'électrons libre, allant de  $10^{18}$  à  $10^{21} \text{ cm}^{-3}$  selon les études [108–111].

Les mécanismes menant à l'absorption de l'énergie laser sont différents pour le LAB femtoseconde selon s'il comporte ou non une couche absorbante métallique.

#### **LAB sans couche absorbante**

Dans le cas du LAB femtoseconde sans couche absorbante, la focalisation d'un laser sub-picoseconde est nécessaire pour outrepasser le seuil de rupture optique d'un liquide faiblement absorbant à la radiation laser [112]. Le transfert de l'énergie dans le liquide se fait alors par absorption multiphotonique et ionisation par avalanche.

Ainsi, ce sont des phénomènes non linéaires qui régissent l'interaction laser/matière. L'absorption multiphotonique est permise par la brièveté et la surtout forte intensité des impulsions ( $10^{12}$  à  $10^{14} \text{ Watt/cm}^2$  en focalisé). Elle entraîne la création d'électrons libres: les premiers éjectés gagnent de l'énergie par effet Bremsstrahlung inverse (absorption de photons par les électrons) qu'ils redistribuent par collisions avec les électrons de la cible. Ceci se poursuit jusqu'à une avalanche d'ionisation (suite d'impacts inter-électrons menant à une augmentation des électrons libres) qui aboutira sur la création d'un plasma qui devient absorbant (cf. Figure 17).

Pour les impulsions femtosecondes, la durée d'impulsion est inférieure au temps caractéristique de diffusion des électrons excités et de transfert de leur énergie vers les atomes du matériau cible [103,111]. Ainsi, pour ces durées d'impulsion, le liquide est vaporisé avant qu'il n'y ait diffusion de la chaleur hors du volume irradié. La zone affectée thermiquement est considérablement réduite par rapport à une impulsion longue ( $>10\text{ps}$  [103]). D'après les expériences de Glezer *et al.* [113], l'impulsion laser absorbée dans le liquide reste confinée autour du col du faisceau (aussi appelé « waist » du faisceau).



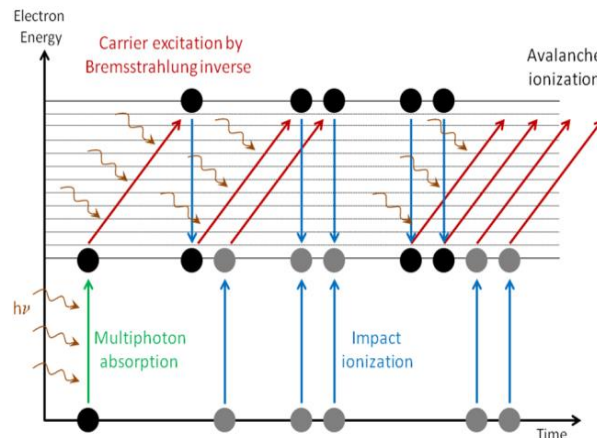


Figure 17 : Absorption multiphotonique et avalanche d'ionisation (John Lopez, Alphanov).

Une valeur élevée de densité d'électrons, de  $10^{21} \text{ cm}^{-3}$  dans l'eau pure pour des durées d'impulsion inférieures à 30 ps d'après Vogel et al. [111], est nécessaire pour créer la densité d'énergie plasma requise à la formation de la bulle de cavitation. Elle résulte de la vaporisation du volume où a lieu la rupture optique dans le cas des lasers femtosecondes [109]. Ce phénomène d'absorption de l'énergie menant à la formation d'une bulle de cavitation a été décrit précédemment par Duocastella *et al.* [114].

## LAB avec couche absorbante métallique

Dans le cas du LAB femtoseconde avec couche absorbante métallique, l'impulsion laser est absorbée par la couche métallique à l'interface du donneur. La brièveté de l'impulsion entraîne une absorption multiphotonique qui peut se coupler à une absorption linéaire si le métal est absorbant à la longueur d'onde laser. Dans le cas d'une couche métallique d'or, le coefficient d'absorption est 0,009 dans l'infrarouge [105], soit une absorption  $<1\%$  du rayonnement reçu. Si l'absorption surpasse le seuil d'ablation du métal, elle résulte en l'expulsion locale de la couche métallique. Ce seuil d'ablation est de  $0,5 \text{ J/cm}^2$  pour une couche d'or et une durée d'impulsion laser sub-picoseconde [115]. L'énergie déposée par laser ultrabref chauffe localement le matériau très rapidement, transformant la matière fondue en vapeur avec une haute énergie cinétique. Ainsi, l'énergie est transférée dans le liquide via la vaporisation du métal et via les effets de pression provenant du plasma d'ablation et reste négligeable par voie thermique, étant donné le caractère ultrabref des impulsions laser [116]. Des effets de pressions supplémentaires peuvent s'appliquer en cas de forte ablation i.e. lorsque la

fluence ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ) est très grande devant le seuil d'ablation. L'énergie déposée dans le liquide va par la suite mener à la formation d'une bulle de cavitation, qui elle-même va pouvoir par la suite engendrer un jet de liquide [117].

### **Effet sur les matériaux biologiques**

Des débris métalliques peuvent être transférés avec le liquide lors du procédé impliquant une couche absorbante métallique [58]. Ceci pourrait affecter l'évolution à long termes des cellules déposées [104]. Cependant, en optimisant les paramètres expérimentaux on pourrait minimiser le nombre de débris potentiels [35].

Des études comparatives de l'effet délétère sur des matériaux biologiques (cellules, protéines, ADN) entre les lasers femtosecondes et nanosecondes avec couche absorbante, aboutissent à des conclusions contraires. Les unes attestent que la survie et le taux de prolifération cellulaire post-transfert sont meilleurs dans le cas des impulsions nanoseconde [35], tandis que d'autres montrent que le taux d'activité de protéines imprimées est supérieur pour les lasers femtosecondes [118]. Dans le cas des lasers femtosecondes, c'est la prépondérance de l'onde de choc qui serait la plus délétère tandis que pour les lasers nanoseconde, ce serait la prédominance l'effet thermique qui affecterait le plus les biomolécules. Cependant, Hopp *et al.* [35] précisent que le choix du laser le moins invasif dépend fortement du type cellulaire transféré. Aussi, des résultats intéressants ont été obtenus, avec un taux de survie cellulaire d'environ 80%, pour des lasers femtosecondes sans couche absorbante et des cellules de mammifères [119,120].

#### **1.4.2.2. Formation de la bulle de cavitation**

Dans le cas du LAB femtoseconde sans couche absorbante, la durée d'impulsion ultrabrève est plus courte que les durées des temps de relaxation du matériau, comprenant le temps de transfert de l'énergie des électrons vers le réseau d'atomes et le temps de conduction thermique [103]. L'impulsion ultrabrève focalisée engendre une haute pression dans le liquide qui se relaxe sous forme d'une onde de choc se propageant vers la surface libre du liquide. Au cours de sa propagation elle perd de l'énergie et devient une onde acoustique [118]. La réflexion de cette onde sur la surface libre crée une onde de raréfaction se propageant dans la direction opposée [121]. Le film de liquide soumis à l'impulsion est détaché du substrat donneur lorsque l'onde de raréfaction atteint la limite substrat/liquide. Le film liquide est ainsi extrait du substrat grâce à l'onde de choc.

### 1.4.2.3. Dynamique de la bulle de cavitation

Le diamètre de la bulle grossit jusqu'à ce qu'il atteigne un diamètre maximum et qu'il déforme progressivement le liquide de l'interface, puis le diamètre diminue en oscillant. La dynamique de la bulle, dans le cas d'une forme sphérique, est décrite par l'équation de Rayleigh-Plesset dans un liquide de volume fini [122–125]. Elle prend en compte l'effet de propriétés rhéologiques de la bioencre, *i.e.* sa tension de surface et sa viscosité.

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{k P_l}{\rho_l} \left(\frac{R_0}{R}\right)^{3\gamma} - \frac{P_l - P_v}{\rho_l} - 4\nu \frac{\dot{R}}{R} - \frac{2\sigma_l}{\rho_l R} \quad (1.4.1)$$

Avec  $\rho_l$  la densité du liquide,  $P_l$  la pression du liquide,  $R$  le rayon de la bulle de vapeur,  $R_0$  le rayon initial de la poche de vapeur,  $\nu$  la viscosité cinématique,  $\sigma_l$  la tension de surface,  $P_v$  la pression saturée dans la poche, et  $k$  le rapport de la pression de gaz dans la poche,  $P_g$ , et de la pression du liquide,  $P_l$ .

Les modélisations montrent que la viscosité de la bioencre a une influence plus importante que la tension de surface sur la dynamique de la bulle de vapeur [105,126].

Aussi, il a été montré par les modélisations que la compressibilité de la bioencre contrôle la dynamique de la bulle. Par exemple pour un film liquide d'eau de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, le front de la bulle atteint rapidement une vitesse maximale (de l'ordre de 100 m/s 100 ns après la génération du plasma) alors que le rayon maximum de la bulle est atteint plus tard (1,2  $\mu\text{s}$ ) [127].

### 1.4.2.4. Formation du jet

La bulle atteint un rayon maximal  $R_{\text{max}}$  avant de s'effondrer sur elle-même [91]. Les forces de pression internes diminuent graduellement avec l'expansion de la bulle. Avec cette expansion, il n'y a plus d'équilibre entre les forces internes et externes et ceci mène à l'effondrement de la bulle. La formation du jet est déterminée par la valeur d'un paramètre sans dimensions,  $\gamma$ .  $\gamma$ , appelé paramètre d'impasse (« standoff distance ») est le rapport entre  $d$  et  $R_{\text{max}}$ , la distance entre le centre de la bulle de vapeur initiale et la surface libre [128,129]. Le paramètre  $\gamma$  est négatif pour un axe défini de la surface libre vers le liquide. Il dépend à la fois de l'énergie laser transférée, de la distance entre la bulle et la surface libre, de la viscosité et de la tension de surface du liquide [91]. Les calculs de Pearson *et al.* montrent que pour des valeurs variées de  $\gamma$ , la déformation de l'interface du liquide progresse initialement à une vitesse élevée et quasi-constante pendant l'expansion de la bulle. Puis, elle ralentit lors de l'effondrement

de la bulle, progressant à une vitesse constante plus faible sous la forme d'un jet (cf. Figure 18).

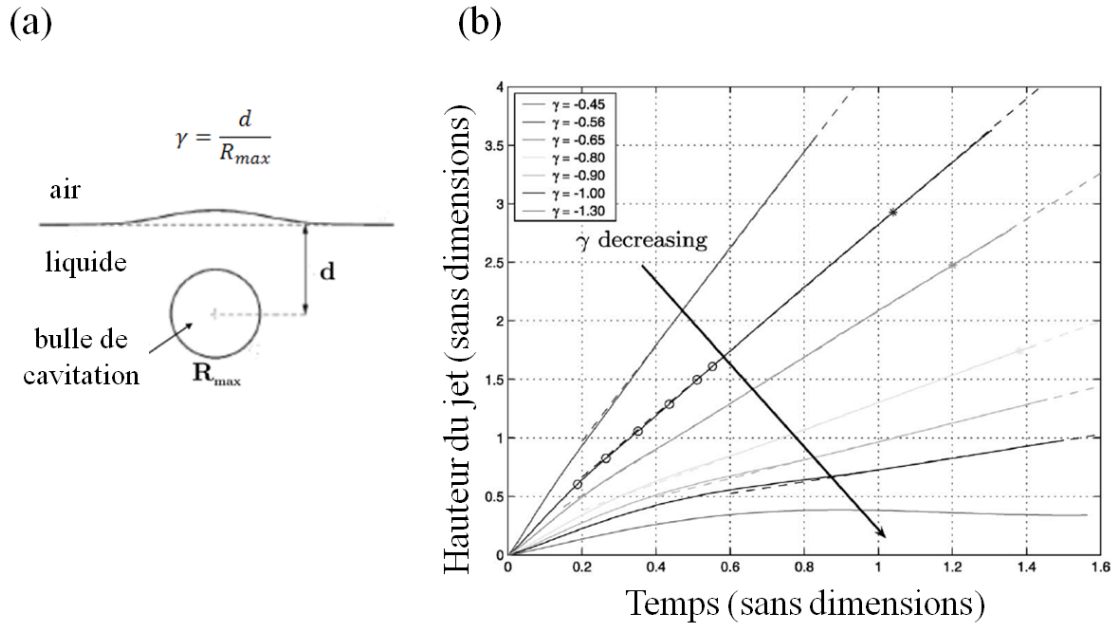


Figure 18 : (a) Illustration du paramètre  $\gamma$  pour une bulle de vapeur dans un liquide, située proche de la surface libre. (b) Calculs de l'évolution de la hauteur du jet (sans dimensions) en fonction du temps (sans dimensions) pour différents  $\gamma$  [128].

Plus  $|\gamma|$  est petit, plus la bulle est proche de la surface libre et pourra engendrer un haut jet (Figure 19).

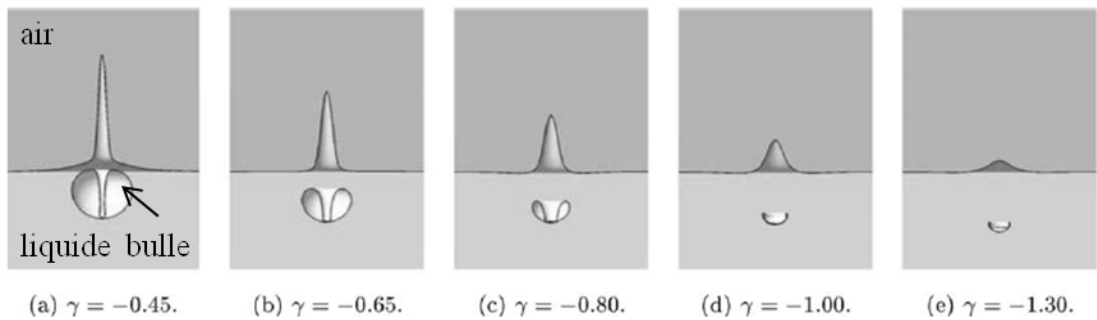


Figure 19 : Schéma de la bulle de vapeur et de la surface du liquide pour différentes valeurs de  $\gamma$  au même temps d'évolution du jet. Ce temps correspond à l'impact du jet progressant vers le bas, avec la frontière basse de la bulle de vapeur [128].

#### 1.4.2.5. Formation du jet et dynamique de la bulle de cavitation

L'imagerie résolue en temps a permis d'observer la bulle de cavitation simultanément avec la formation du jet de liquide [130]. Elle a ainsi confirmé des mécanismes dépeints par les simulations [128] (cf. Figure 21).

Le mécanisme d'éjection du jet est composé de la formation de deux jets simultanés dont la dynamique est corrélée avec celle de la bulle de cavitation générée par laser et se développant à proximité de la surface libre du liquide (*cf.* Figure 20). Une bulle de cavitation initiale quasi-sphérique se forme puis elle subit des cycles d'expansion/effondrement sous l'action des fortes forces de pression développées par la forte intensité laser. Au cours de sa première expansion, la bulle va déformer la surface du liquide, jusqu'à ce que les gradients de pression induits engendrent un jet de liquide, au-dessus de la surface du liquide, et un « contre-jet » symétrique, dans la bulle de vapeur. L'observation de la division de la bulle initiale en deux, à la suite de cette étape, atteste la présence du « contre-jet » lors du processus. La division de la bulle est provoquée lorsque le contre-jet impacte la frontière de la bulle située vers le bas. Il engendre aussi un changement de géométrie de la bulle qui tend alors vers une forme toroïdale [130].

Les formations de la bulle de cavitation et du jet, décrites par ces travaux expérimentaux, sont conformes aux solutions des équations fluidiques simulant l'évolution de la bulle de cavitation proche de la surface libre du liquide [131,132].

La bulle toroïdale croît ensuite menant à de nouveaux gradients de pression et à la formation d'un jet cylindrique, en plus du précédent jet formé. La forme cylindrique de ce nouveau jet est liée à la forme toroïdale de la bulle. Les bulles générées coulent progressivement dans le liquide vers le substrat à cause du contre-jet qui exerce une force de poussée vers le bas. Les cycles d'expansion/effondrement suivants de la bulle qui pourraient avoir lieu ne devraient pas avoir d'effet sur le phénomène d'éjection du liquide.

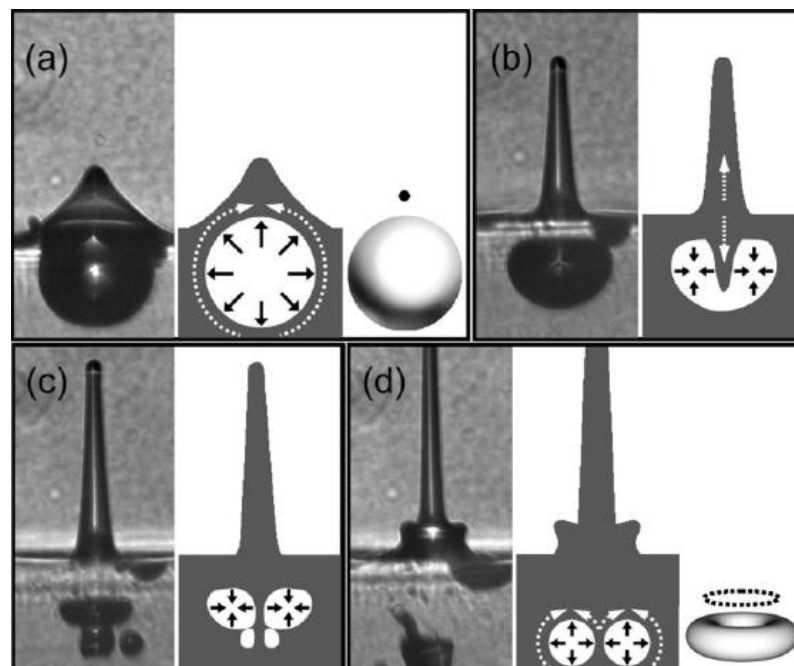


Figure 20 : Schémas et images résolues en temps de la dynamique du jet de liquide liée au comportement de la bulle de cavitation [130].

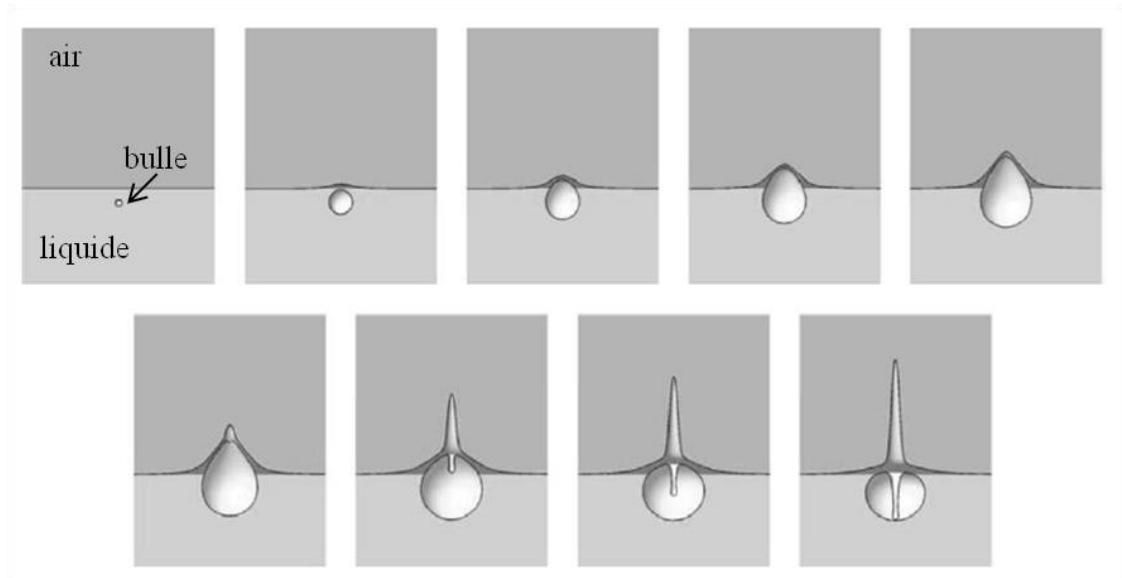


Figure 21 : Schémas de la bulle de vapeur et de la déformation de la surface du liquide au cours du temps, jusqu'à l'impact du jet progressant vers le bas, avec la frontière basse de la bulle de vapeur [128].

#### 1.4.2.6. Rupture du jet

Suite à la formation du jet de liquide, celui-ci devient plus haut et fin, puis en continuant à s'élever, il finit par se rompre en gouttelettes. Cette rupture peut être causée par différents mécanismes : l'instabilité de Rayleigh-Plateau, le régime « first wind-induced », le régime « second wind-induced », et des mécanismes d'atomisation (*cf.* Figure 22). Ils correspondent à différentes combinaisons entre les propriétés d'inertie du liquide, de tension de surface et les forces aérodynamiques agissant sur le jet. Aussi, ils résultent en la formation de gouttes, de diamètres caractéristiques par rapport au diamètre du jet. Ainsi, un régime est identifiable notamment via les diamètres de gouttes produites. Par exemple pour le régime de Rayleigh, les diamètres de gouttes sont plus larges que le diamètre du jet.

Lors de la rupture du jet par mécanisme de Rayleigh, la force inertielle capillaire est principalement responsable de la croissance des perturbations le long du jet. Elle mène à un pincement du jet et la force aérodynamique, due au mouvement relatif entre le jet de liquide et le gaz ambiant, est négligeable. Le régime « first wind-induced » a

lieu lorsque la vitesse du jet augmente. Ce régime est dirigé par une force aérodynamique plus importante que la rupture du jet de Rayleigh. La force entraîne une croissance plus rapide des perturbations le long du jet, menant à une rupture du jet plus rapide et à une longueur de jet plus faible lors de la rupture [133,134]. Le régime « second wind-induced » voit la vitesse du jet encore augmenter tout comme pour le régime d'atomisation. Lors de ces deux régimes, la croissance des perturbations est dirigée essentiellement par la force aérodynamique et les gouttes bien plus petites que le diamètre du jet et que pour les mécanismes de Rayleigh et de « first wind-induced » sont produites [135].

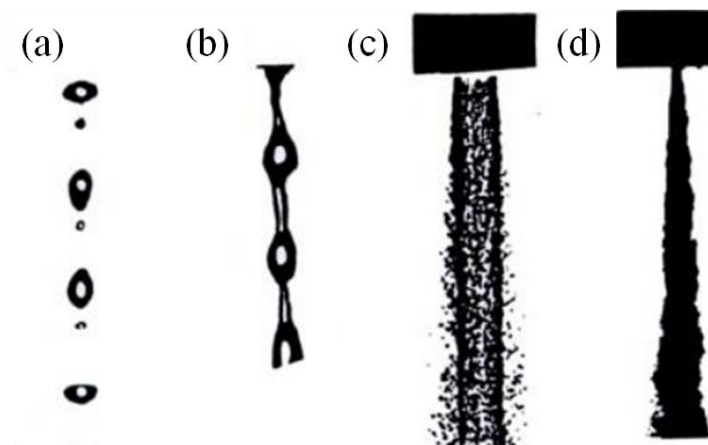


Figure 22 : Les différents régimes de ruptures d'un jet. Le jet est généré ici par une buse. a) Rupture de Rayleigh. Les diamètres de gouttes sont plus larges que le diamètre du jet. La rupture survient en de nombreux points en aval de la buse. b) Régime de "first wind-induced". Les diamètres de gouttes sont du même ordre de grandeur que le diamètre du jet. La rupture survient en de nombreux points en aval de la buse. c) Régime de "second wind-induced". Les tailles de gouttes sont plus petites que le diamètre du jet. La rupture débute à une certaine distance en aval de la buse. d) Régime d'atomisation. Les diamètres de gouttes sont bien plus petits que le diamètre du jet (spray). La rupture débute à la sortie de la buse. [136]

Puisque la formation des gouttelettes n'est pas facilement contrôlable pour les mécanismes de « second wind-induced » et d'atomisation (formation de spray), ils ne sont pas intéressants pour le LIFT ou le LAB. Seuls les phénomènes d'instabilité de Rayleigh-Plateau et de régime « first wind-induced » pourront générer une formation de gouttelettes adaptée à l'impression par laser. Cependant, la haute vitesse du jet dans le régime « first wind-induced » rend ce régime peu adéquat au LAB, et notamment à l'impression de cellules. En effet, une faible vitesse de jet est plus adaptée à l'impression de cellules ou de biomolécules sensibles, pour minimiser la force de l'impact lors de l'impression sur un substrat et l'effet délétère de l'impression [67,137,138].

La plupart des ruptures de jet cylindriques sont attribués à l'instabilité de Rayleigh-Plateau [135]. Ce phénomène a été étudié et expliqué précédemment [139,140]. L'instabilité est due aux effets de tension de surface. Le jet de liquide, assimilé à une colonne cylindrique ou pont de liquide, devient instable à partir du moment où sa longueur dépasse sa circonférence :

$$L > 2\pi R \quad (1.4.2)$$

Cette limite peut être traduite en termes de rapport d'aspect maximum :

$$\Lambda = \frac{L}{2R} > \pi \quad (1.4.3)$$

La tension de surface tend à minimiser l'énergie de surface du système. Lorsque le système devient instable et que l'on dépasse le rapport d'aspect maximum, des perturbations augmentent le long du jet jusqu'à provoquer sa rupture en gouttelettes. Cet état correspond à une énergie de surface inférieure à celle du jet.

Cependant, cette limite de rapport d'aspect ne prend pas en compte l'influence de la gravité, qui abaisse le seuil du rapport d'aspect maximum [141]. La prise en compte de la gravité se fait via le nombre de Bond, qui correspond au rapport entre les forces de gravité et de tension de surface :

$$B_0(\Delta\rho, R) = \frac{\Delta\rho g R^2}{\sigma} \quad (1.4.4)$$

R est le rayon du pont de liquide,  $\sigma$  la tension de surface, g la constante gravitationnelle,  $\Delta\rho$  la différence de masse volumique entre le pont de liquide et le fluide environnant. Les calculs de Coriell *et al.* [141], décrivent le rapport d'aspect maximum en fonction du nombre de Bond  $B_0$ . Ceux-ci ont été représentés par Casner [140] sur la figure ci-dessous.



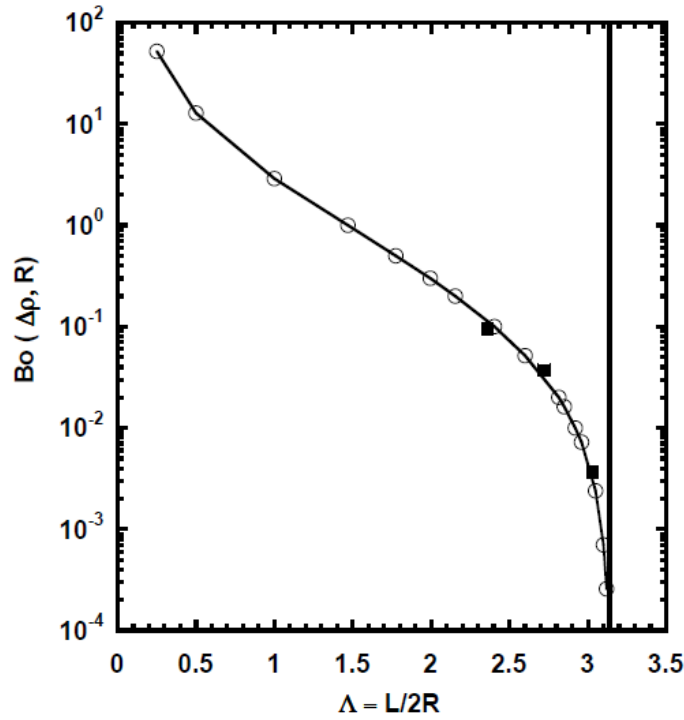


Figure 23 : Rapport d'aspect maximum d'un pont de liquide en prenant en compte l'effet de la gravité. Extrait de [140]. Les cercles (○) correspondent aux calculs de Coriell et al [141]. Les points (■) sont les rapports d'aspect maximum de ponts, mesurés expérimentalement par Vizika et al. Pour trois combinaisons différentes de fluides [19]. La ligne verticale en trait plein représente le rapport d'aspect limite  $\Delta=\pi$  en l'absence de gravité.

$\Delta\rho$  est une valeur absolue car on observe la stabilité de la colonne de liquide indépendamment du signe de la différence entre la colonne et le fluide environnant. Sans gravité, le rapport d'aspect limite, avant rupture de la colonne en gouttelettes, est maximal et vaut  $\Delta=\pi$  pour  $Bo=0$ . On l'observe en trait plein sur la figure. Lorsque la gravité est présente, le rapport d'aspect limite est inférieur à  $\Delta=\pi$  et est représenté par la courbe Figure 23. Plus la force de gravité est présente dans l'interaction avec le jet de liquide, plus le nombre de Bond  $Bo$  augmente et plus le rapport d'aspect limite diminue. Ainsi, plus les forces de gravité sont importantes par rapport à la tension de surface, plus la hauteur de jet avant rupture en gouttelettes est petite.

## 1.5. Objectifs de la thèse

---

L'objectif général de la thèse était d'étudier les mécanismes physiques de deux procédés de bioimpression par laser femtoseconde, le premier impliquant une couche absorbante métallique, et le second sans couche absorbante. Pour ce faire, des objectifs secondaires ont été définis :

- Etudier le LAB femtoseconde avec couche absorbante métallique sur une bioimprimante adaptée au transfert de cellules (MODULAB®). Les paramètres variés lors du procédé seront la rhéologie de la bioencre, certains paramètres laser, la position de focalisation laser. De plus, le procédé sera étudié via la morphologie du jet de l'impression par imagerie résolue en temps (TRI) et via des tests de survie cellulaire
- Adapter un système d'imagerie résolue en temps pour étudier les effets de la viscosité sur la dynamique de l'éjection
- Définir les conditions de transfert pour la bioimprimante du LAB femtoseconde avec couche absorbante métallique pour des bioencres modèle avec différentes propriétés rhéologiques et une bioencre de cellules
- Développer une nouvelle approche du LAB femtoseconde sans couche absorbante en utilisant un réservoir de bioencre
- Etudier le LAB femtoseconde sans couche absorbante sur un montage prototype via des paramètres opératoires clés (position de focalisation, ouverture numérique de l'objectif de focalisation, diamètre de goutte imprimé, la hauteur du jet de l'impression par imagerie résolue en temps (TRI), la distance de transfert limite pour imprimer)
- Proposer des conditions opératoires optimales pour les deux procédés

1. R. Langer and J. Vacanti, "Tissue engineering," *Science* **260**, 920–926 (1993).
2. L. G. Griffith and G. Naughton, "Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities," *Science* **295**, 1009–1014 (2002).
3. B. Guillotin and F. Guillemot, "Cell patterning technologies for organotypic tissue fabrication," *Trends Biotechnol.* **29**, 183–190 (2011).
4. I. T. Ozbolat and Yin Yu, "Bioprinting Toward Organ Fabrication: Challenges and Future Trends," *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **60**, 691–699 (2013).
5. A. Tamayol, M. Akbari, N. Annabi, A. Paul, A. Khademhosseini, and D. Juncker, "Fiber-based tissue engineering: Progress, challenges, and opportunities," *Biotechnol. Adv.* (2012).
6. A. L. Berrier and K. M. Yamada, "Cell-matrix adhesion," *J. Cell. Physiol.* **213**, 565–573 (2007).
7. T. H. Petersen, E. A. Calle, L. Zhao, E. J. Lee, L. Gui, M. B. Raredon, K. Gavrilov, T. Yi, Z. W. Zhuang, C. Breuer, E. Herzog, and L. E. Niklason, "Tissue-Engineered Lungs for in Vivo Implantation," *Science* **329**, 538–541 (2010).
8. B. E. Uygun, A. Soto-Gutierrez, H. Yagi, M.-L. Izamis, M. A. Guzzardi, C. Shulman, J. Milwid, N. Kobayashi, A. Tilles, F. Berthiaume, M. Hertl, Y. Nahmias, M. L. Yarmush, and K. Uygun, "Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix," *Nat. Med.* **16**, 814–820 (2010).
9. K. Lee, E. A. Silva, and D. J. Mooney, "Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments," *J. R. Soc. Interface* **8**, 153–170 (2011).
10. E. S. Place, N. D. Evans, and M. M. Stevens, "Complexity in biomaterials for tissue engineering," *Nat Mater* **8**, 457–70 (2009).
11. S. Moon, S. K. Hasan, Y. S. Song, F. Xu, H. O. Keles, F. Manzur, S. Mikkilineni, J. W. Hong, J. Nagatomi, E. Haeggstrom, A. Khademhosseini, and U. Demirci, "Layer by Layer Three-dimensional Tissue Epitaxy by Cell-Laden Hydrogel Droplets," *Tissue Eng. Part C Methods* **16**, 157–166 (2010).
12. W. C. Wilson and T. Boland, "Cell and organ printing 1: protein and cell printers," *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **272**, 491–496 (2003).
13. F. Guillemot, V. Mironov, and M. Nakamura, "Bioprinting is coming of age: report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09)," *Biofabrication* **2**, 010201 (2010).
14. V. Mironov, R. P. Visconti, V. Kasyanov, G. Forgacs, C. J. Drake, and R. R. Markwald, "Organ printing: Tissue spheroids as building blocks," *Biomaterials* **30**, 2164–2174 (2009).
15. R. J. Klebe, "Cytoscribing: A method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues," *Exp. Cell Res.* **179**, 362–373 (1988).
16. R. J. Klebe, C. A. Thomas, G. M. Grant, A. Grant, and P. Gosh, "Cytoscription: Computer controlled micropositioning of cell adhesion proteins and cells," *Methods Cell Sci.* **16**, 189–192 (1994).
17. T. Boland, T. Xu, B. Damon, and X. Cui, "Application of inkjet printing to tissue engineering," *Biotechnol. J.* **1**, 910–7 (2006).
18. V. Mironov, T. Boland, T. Trusk, G. Forgacs, and R. R. Markwald, "Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering," *Trends Biotechnol.* **21**, 157–161 (2003).
19. T. Xu, J. Jin, C. Gregory, J. J. Hickman, and T. Boland, "Inkjet printing of viable mammalian cells," *Biomaterials* **26**, 93–99 (2005).
20. M. Nakamura, A. Kobayashi, F. Takagi, A. Watanabe, Y. Hiruma, K. Ohuchi, Y. Iwasaki, M. Horie, I. Morita, and S. Takatani, "Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells," *Tissue Eng.* **11**, 1658–1666 (2005).

21. E. . Roth, T. Xu, M. Das, C. Gregory, J. . Hickman, and T. Boland, "Inkjet printing for high-throughput cell patterning," *Biomaterials* **25**, 3707–3715 (2004).
22. K. Iwami, T. Noda, K. Ishida, K. Morishima, M. Nakamura, and N. Umeda, "Bio rapid prototyping by extruding/aspirating/refilling thermoreversible hydrogel," *Biofabrication* **2**, 014108 (2010).
23. G. Vozzi and A. Ahluwalia, "Microfabrication for tissue engineering: rethinking the cells-on-a scaffold approach," *J. Mater. Chem.* **17**, 1248–1254 (2007).
24. K. Nair, M. Gandhi, S. Khalil, K. C. Yan, M. Marcolongo, K. Barbee, and W. Sun, "Characterization of cell viability during bioprinting processes," *Biotechnol. J.* **4**, 1168–1177 (2009).
25. M. Vaezi, H. Seitz, and S. Yang, "A review on 3D micro-additive manufacturing technologies," *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* **67**, 1721–1754 (2013).
26. D. J. Odde and M. J. Renn, "Laser-guided direct writing for applications in biotechnology," *Trends Biotechnol* **17**, 385–9 (1999).
27. J. Bohandy, B. F. Kim, and F. J. Adrian, "Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser," *J. Appl. Phys.* **60**, 1538–1539 (1986).
28. J. Bohandy, B. F. Kim, F. J. Adrian, and A. N. Jette, "Metal deposition at 532 nm using a laser transfer technique," *J. Appl. Phys.* **63**, 1158 (1988).
29. E. Fogarassy, C. Fuchs, F. Kerherve, G. Hauchecorne, and J. Perriere, "Laser-induced forward transfer of high-Tc YBaCuO and BiSrCaCuO superconducting thin films," *J. Appl. Phys.* **66**, 457–459 (1989).
30. J. A. Barron, P. Wu, H. D. Ladouceur, and B. R. Ringeisen, "Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns," *Biomed. Microdevices* **6**, 139–147 (2004).
31. J. M. Fernández-Pradas, M. Colina, P. Serra, J. Domínguez, and J. L. Morenza, "Laser-induced forward transfer of biomolecules," *Thin Solid Films* **453–454**, 27–30 (2004).
32. M. Colina, P. Serra, J. M. Fernández-Pradas, L. Sevilla, and J. L. Morenza, "DNA deposition through laser induced forward transfer," *Biosens. Bioelectron.* **20**, 1638–1642 (2005).
33. C. Unger, M. Gruene, L. Koch, J. Koch, and B. N. Chichkov, "Time-resolved imaging of hydrogel printing via laser-induced forward transfer," *Appl. Phys. A* **103**, 271–277 (2011).
34. J. A. Barron, B. J. Spargo, and B. R. Ringeisen, "Biological laser printing of three dimensional cellular structures," *Appl. Phys. A* **79**, (2004).
35. B. Hopp, "Femtosecond laser printing of living cells using absorbing film-assisted laser-induced forward transfer," *Opt. Eng.* **51**, 014302 (2012).
36. F. Auger, M. Rouabhia, F. Goulet, F. Berthod, V. Moulin, and L. Germain, "Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen-populated hydrated gels: clinical and fundamental applications," *Med. Biol. Eng. Comput.* **36**, 801–812 (1998).
37. Y. Lin, G. Huang, Y. Huang, T.-R. J. Tzeng, and D. Chrisey, "Effect of laser fluence in laser assisted direct writing of human colon cancer cell," *Rapid Prototyp. J.* **16**, 202 – 208 (2010).
38. B. R. Ringeisen, H. Kim, J. A. Barron, D. B. Krizman, D. B. Chrisey, S. Jackman, R. Y. . Auyeung, and B. J. Spargo, "Laser Printing of Pluripotent Embryonal Carcinoma Cells," *Tissue Eng.* **10**, 483–491 (2004).
39. J. A. Barron, B. R. Ringeisen, H. Kim, B. J. Spargo, and D. B. Chrisey, "Application of laser printing to mammalian cells," *Thin Solid Films* **453–454**, 383–387 (2004).
40. A. Doraiswamy, R. J. Narayan, T. Lippert, L. Urech, A. Wokaun, M. Nagel, B. Hopp, M. Dinescu, R. Modi, R. C. Y. Auyeung, and D. B. Chrisey, "Excimer laser forward transfer of mammalian cells using a novel triazene absorbing layer," *Appl. Surf. Sci.* **252**, 4743–4747 (2006).
41. S. Catros, J.-C. Fricain, B. Guillotin, B. Pippenger, R. Bareille, M. Remy, E. Lebraud, B. Desbat, J. Amédée, and F. Guillemot, "Laser-assisted bioprinting for creating on-demand

- patterns of human osteoprogenitor cells and nano-hydroxyapatite," *Biofabrication* **3**, 025001 (2011).
42. B. Guillotin, A. Souquet, S. Catros, M. Duocastella, B. Pippenger, S. Bellance, R. Bareille, M. Rémy, L. Bordenave, J. Amédée, and F. Guillemot, "Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization," *Biomaterials* **31**, 7250–7256 (2010).
  43. B. R. Ringeisen, J. Callahan, P. K. Wu, A. Piqué, B. Spargo, R. A. McGill, M. Bucaro, H. Kim, D. M. Bubb, and D. B. Chrisey, "Novel Laser-Based Deposition of Active Protein Thin Films," *Langmuir* **17**, 3472–3479 (2001).
  44. A. Pique, D. B. Chrisey, R. C. Y. Auyeung, S. Lakeou, R. Chung, R. A. McGill, P. K. Wu, M. T. Duignan, J. M. Fitz-Gerald, and H. D. Wu, "Laser direct writing of circuit elements and sensors," in J. J. Dubowski, H. Helvajian, E.-W. Kreutz, and K. Sugioka, eds. (1999), pp. 330–339.
  45. A. Piqué, R. A. McGill, D. B. Chrisey, D. Leonhardt, T. E. Mslina, B. J. Spargo, J. H. Callahan, R. W. Vachet, R. Chung, and M. A. Bucaro, "Growth of organic thin films by the matrix assisted pulsed laser evaporation (MAPLE) technique," *Thin Solid Films* **355-356**, 536–541 (1999).
  46. A. Piqué, D. B. Kohn, Auyeung, R.C.Y, J. Fitz-Gerald, H. D. Wu, R. A. McGill, S. Lakeou, V. Nguyen, and M. Duignan, "A novel laser transfer process for direct writing of electronic and sensor materials," *Appl. Phys. Mater. Sci. Process.* **69**, S279–S284 (1999).
  47. R. Eason, ed., *Pulsed Laser Deposition of Thin Films: Applications-Led Growth of Functional Materials* (John Wiley & Sons, Inc., 2006).
  48. D. B. Chrisey, A. Piqué, R. A. McGill, J. S. Horwitz, B. R. Ringeisen, D. M. Bubb, and P. K. Wu, "Laser Deposition of Polymer and Biomaterial Films," *Chem. Rev.* **103**, 553–576 (2003).
  49. Young HD, Auyeung R C Y, Chrisley D B, and Dlott D D, "Jetting behavior in the laser forward transfer of rheological systems," (2004).
  50. R. Modi, H. D. Wu, R. C. Y. Auyeung, C. M. Gilmore, and D. B. Chrisey, "Direct writing of polymer thick film resistors using a novel laser transfer technique," *J. Mater. Res.* **16**, 3214–3222 (2001).
  51. B. R. Ringeisen, D. B. Chrisey, A. Piqué, H. D. Young, J. Jones-Meehan, R. Modi, M. Bucaro, and B. J. Spargo, "Generation of mesoscopic patterns of viable *Escherichia coli* by ambient laser transfer," *Biomaterials* **23**, 161–166 (2002).
  52. P. K. Wu, B. R. Ringeisen, D. B. Krizman, C. G. Frondoza, M. Brooks, D. M. Bubb, R. C. Y. Auyeung, A. Piqué, B. Spargo, R. A. McGill, and D. B. Chrisey, "Laser transfer of biomaterials: Matrix-assisted pulsed laser evaporation (MAPLE) and MAPLE Direct Write," *Rev. Sci. Instrum.* **74**, 2546 (2003).
  53. B. Hopp, T. Smausz, N. Kresz, N. Barna, Z. Bor, L. Kolozsvári, D. B. Chrisey, A. Szabó, and A. Nógrádi, "Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer," *Tissue Eng.* **11**, 1817–23 (2005).
  54. W. A. Tolbert, I.-Y. Sandy Lee, M. M. Doxtader, E. W. Ellis, and D. D. Dlott, "High-speed color imaging by laser ablation transfer with a dynamic release layer: fundamental mechanisms," *J. Imaging Sci. Technol.* **37**, 411–421 (1993).
  55. F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, J. Lopez, M. Faucon, B. Pippenger, R. Bareille, M. Rémy, S. Bellance, P. Chabassier, J. C. Fricain, and J. Amédée, "High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering," *Acta Biomater.* **6**, 2494–2500 (2010).
  56. Y. Nakata, T. Okada, and M. Maeda, "Transfer of Laser Dye by Laser-Induced Forward Transfer," *Jpn. J. Appl. Phys.* **41**, L839–L841 (2002).
  57. M. S. Brown, N. T. Kattamis, and C. B. Arnold, "Time-resolved dynamics of laser-induced micro-jets from thin liquid films," *Microfluid. Nanofluidics* **11**, 199–207 (2011).

58. T. Smausz, B. Hopp, G. Kecskeméti, and Z. Bor, "Study on metal microparticle content of the material transferred with Absorbing Film Assisted Laser Induced Forward Transfer when using silver absorbing layer," *Appl. Surf. Sci.* **252**, 4738–4742 (2006).
59. C. M. Othon, X. Wu, J. J. Anders, and B. R. Ringeisen, "Single-cell printing to form three-dimensional lines of olfactory ensheathing cells," *Biomed. Mater.* **3**, 034101 (2008).
60. D. P. Banks, K. Kaur, R. Gazia, R. Fardel, M. Nagel, T. Lippert, and R. W. Eason, "Triazene photopolymer dynamic release layer-assisted femtosecond laser-induced forward transfer with an active carrier substrate," *EPL Europhys. Lett.* **83**, 38003 (2008).
61. C. Boutopoulos, V. Tsouti, D. Goustouridis, S. Chatzandroulis, and I. Zergioti, "Liquid phase direct laser printing of polymers for chemical sensing applications," *Appl. Phys. Lett.* **93**, 191109 (2008).
62. R. Fardel, M. Nagel, F. Nüesch, T. Lippert, and A. Wokaun, "Fabrication of organic light-emitting diode pixels by laser-assisted forward transfer," *Appl. Phys. Lett.* **91**, 061103 (2007).
63. D. P. Banks, C. Grivas, I. Zergioti, and R. W. Eason, "Ballistic laser-assisted solid transfer (BLAST) from a thin film precursor," *Opt. Express* **16**, 3249 (2008).
64. V. Dinca, A. Patrascioiu, J. M. Fernández-Pradas, J. L. Morenza, and P. Serra, "Influence of solution properties in the laser forward transfer of liquids," *Appl. Surf. Sci.* **258**, 9379–9384 (2012).
65. M. Nagel, R. Hany, T. Lippert, M. Molberg, F. A. Nüesch, and D. Rentsch, "Aryltriazene Photopolymers for UV-Laser Applications: Improved Synthesis and Photodecomposition Study," *Macromol. Chem. Phys.* **208**, 277–286 (2007).
66. N. T. Kattamis, P. E. Purnick, R. Weiss, and C. B. Arnold, "Thick film laser induced forward transfer for deposition of thermally and mechanically sensitive materials," *Appl. Phys. Lett.* **91**, 171120–3 (2007).
67. S. Catros, B. Guillotin, M. Bacáková, J.-C. Fricain, and F. Guillemot, "Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting," *Appl. Surf. Sci.* **257**, 5142–5147 (2011).
68. C. B. Arnold, P. Serra, and A. Piqué, "Laser Direct-Write Techniques for Printing of Complex Materials," *MRS Bull.* **32**, (2007).
69. A. Piqué, "Laser Transfer Techniques for Digital Microfabrication," in *Laser Precision Microfabrication*, K. Sugioka, M. Meunier, and A. Piqué, eds. (Springer Berlin Heidelberg, 2010), Vol. 135, pp. 259–291.
70. H. Kim, J. S. Melinger, A. Khachatryan, N. A. Charipar, R. C. Y. Auyeung, and A. Piqué, "Fabrication of terahertz metamaterials by laser printing," *Opt. Lett.* **35**, 4039 (2010).
71. I. Zergioti, "Laser Printing of Organic Electronics and Sensors," *J. Laser MicroNanoengineering* **8**, 30–34 (2013).
72. P. Serra, "Laser-induced forward Transfer: a Direct-writing Technique for Biosensors Preparation," *J. Laser MicroNanoengineering* **1**, 236–242 (2006).
73. M. Duocastella, J. M. Fernández-Pradas, P. Serra, and J. L. Morenza, "Jet formation in the laser forward transfer of liquids," *Appl. Phys. A* **93**, 453–456 (2008).
74. M. Duocastella, J. M. Fernández-Pradas, J. L. Morenza, D. Zafra, and P. Serra, "Novel laser printing technique for miniaturized biosensors preparation," *Sens. Actuators B Chem.* **145**, 596–600 (2010).
75. M. Colina, M. Duocastella, J. M. Fernández-Pradas, P. Serra, and J. L. Morenza, "Laser-induced forward transfer of liquids: Study of the droplet ejection process," *J. Appl. Phys.* **99**, 084909 (2006).
76. M. Ali, E. Pages, A. Ducom, A. Fontaine, and F. Guillemot, "Controlling laser-induced jet formation for bioprinting mesenchymal stem cells with high viability and high resolution," *Biofabrication* **6**, 045001 (2014).

77. C. Florian, F. Caballero-Lucas, J. M. Fernández-Pradas, R. Artigas, S. Ogier, D. Karnakis, and P. Serra, "Conductive silver ink printing through the laser-induced forward transfer technique," *Appl. Surf. Sci.* **336**, 304–308 (2015).
78. L. Rapp, J. Ailuno, A. P. Alloncle, and P. Delaporte, "Pulsed-laser printing of silver nanoparticles ink: control of morphological properties," *Opt. Express* **19**, 21563 (2011).
79. M. Baum, H. Kim, I. Alexeev, A. Piqué, and M. Schmidt, "Generation of transparent conductive electrodes by laser consolidation of LIFT printed ITO nanoparticle layers," *Appl. Phys. A* **111**, 799–805 (2013).
80. P. Delaporte and A.-P. Alloncle, "Laser-induced forward transfer: A high resolution additive manufacturing technology," *Opt. Laser Technol.* (2015).
81. T. Mattle, J. Shaw-Stewart, A. Hintennach, C. W. Schneider, T. Lippert, and A. Wokaun, "Shadowgraphic investigations into the laser-induced forward transfer of different SnO<sub>2</sub> precursor films," *Appl. Surf. Sci.* (2012).
82. Kaneko, A, Hitomi C., and Hoshikawa J., "Laser printer and thermal transfer printing method," European Patent patent 0 542 544 A3 (May 19, 1993).
83. Hutt, K. W., Hann, R. A., and Tran, H. C. V., "Laser dye thermal transfer printing," U.S. Patent and Trademark Office patent 5,864,356 (1999).
84. Moulin, M. and Huang, J., "Method and apparatus for laser-induced thermal transfer printing," United State Patent patent US6894713 B2 (2005).
85. F. K. Jäger, J. Kaczun, U. Lehmann, and B. Se, "Printing machine and method for printing a substrate," U.S. Patent patent US20110292159 A1 (December 14, 2009).
86. U. Lehmann, D. Meyer, and A. I. GmbH, "Quality printing method, printing machine, and corresponding printing substance," U.S. Patent and Trademark Office patent US7154522 B2 (February 19, 2003).
87. U. Lehmann and A. I. GmbH, "Method of printing and corresponding print machine," U.S. Patent and Trademark Office patent US7137697 B2 (March 28, 2001).
88. U. Lehmann, A. I. GmbH, and B. Se, "Printing machine and printing method therefor," U.S. Patent and Trademark Office patent (2012).
89. S. Chakraborty, H. Sakata, E. Yokoyama, M. Wakaki, and D. Chakravorty, "Laser-induced forward transfer technique for maskless patterning of amorphous V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> thin film," *Appl. Surf. Sci.* **254**, 638–643 (2007).
90. B. Thomas, A. P. Alloncle, P. Delaporte, M. Sentis, S. Sanaur, M. Barret, and P. Collot, "Experimental investigations of laser-induced forward transfer process of organic thin films," *Appl. Surf. Sci.* **254**, 1206–1210 (2007).
91. F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, and B. Guillotin, "Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering," *Nanomed.* **5**, 507–515 (2010).
92. B. R. Ringeisen, C. M. Othon, J. A. Barron, D. Young, and B. J. Spargo, "Jet-based methods to print living cells," *Biotechnol. J.* **1**, 930–48 (2006).
93. V. Keriquel, F. Guillemot, I. Arnault, B. Guillotin, S. Miraux, J. Amédée, J.-C. Fricain, and S. Catros, "In vivo bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice," *Biofabrication* **2**, 014101 (2010).
94. N. R. Schiele, D. T. Corr, Y. Huang, N. A. Raof, Y. Xie, and D. B. Chrisey, "Laser-based direct-write techniques for cell printing," *Biofabrication* **2**, 032001 (2010).
95. N. R. Schiele, D. B. Chrisey, and D. T. Corr, "Gelatin-Based Laser Direct-Write Technique for the Precise Spatial Patterning of Cells," *Tissue Eng. Part C Methods* **17**, 289–98 (2011).
96. A. Doraiswamy, R. J. Narayan, M. L. Harris, S. B. Qadri, R. Modi, and D. B. Chrisey, "Laser microfabrication of hydroxyapatite-osteoblast-like cell composites," *J. Biomed. Mater. Res. A* **80A**, 635–643 (2007).
97. P. Serra, J. M. Fernandez-Pradas, F. X. Berthet, M. Colina, J. Elvira, and J. L. Morenza, "Laser direct writing of biomolecule microarrays," *Appl. Phys. A* **79**, (2004).

98. E. Stratakis, A. Ranella, M. Farsari, and C. Fotakis, "Laser-based micro/nanoengineering for biological applications," *Prog. Quantum Electron.* **33**, 127–163 (2009).
99. F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, J. Lopez, M. Faucon, B. Pippenger, R. Bareille, M. Rémy, S. Bellance, P. Chabassier, J. C. Fricain, and J. Amédée, "High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering," *Acta Biomater.* **6**, 2494–2500 (2010).
100. C. M. Othon, X. Wu, J. J. Anders, and B. R. Ringeisen, "Single-cell printing to form three-dimensional lines of olfactory ensheathing cells," *Biomed. Mater.* **3**, 034101 (2008).
101. S. Catros, F. Guillemot, A. Nandakumar, S. Ziane, L. Moroni, P. Habibovic, C. van Blitterswijk, B. Rousseau, O. Chassande, J. Amédée, and J.-C. Fricain, "Layer-by-layer tissue microfabrication supports cell proliferation in vitro and in vivo," *Tissue Eng. Part C Methods* **18**, 62–70 (2012).
102. Y. Lin, Y. Huang, and D. B. Chrisey, "Metallic Foil-Assisted Laser Cell Printing," *J. Biomech. Eng.* **133**, 025001 (2011).
103. A. Karaiskou, I. Zergioti, C. Fotakis, M. Kapsetaki, and D. Kafetzopoulos, "Microfabrication of biomaterials by the sub-ps laser-induced forward transfer process," *Appl. Surf. Sci.* **208-209**, 245–249 (2003).
104. I. Papageorgiou, C. Brown, R. Schins, S. Singh, R. Newson, S. Davis, J. Fisher, E. Ingham, and C. P. Case, "The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts in vitro," *Biomaterials* **28**, 2946–2958 (2007).
105. A. Souquet, *Etude Des Processus Physiques Mis En Jeu Lors de La Microimpression D'éléments Biologiques Assistée Par Laser* (Bordeaux 1, 2011).
106. C. Schaffer, N. Nishimura, E. Glezer, A. Kim, and E. Mazur, "Dynamics of femtosecond laser-induced breakdown in water from femtoseconds to microseconds," *Opt. Express* **10**, 196–203 (2002).
107. A. Vogel, "Shock wave emission and cavitation bubble generation by picosecond and nanosecond optical breakdown in water," *J. Acoust. Soc. Am.* **100**, 148 (1996).
108. P. L. Knight, "The Principles of Nonlinear Optics," *Opt. Acta Int. J. Opt.* **32**, 1–2 (1985).
109. N. Bloembergen, "Laser-induced electric breakdown in solids," *IEEE J. Quantum Electron.* **10**, 375–386 (1974).
110. P. K. Kennedy, S. A. Boppart, D. X. Hammer, B. A. Rockwell, G. D. Noojin, and W. P. Roach, "A first-order model for computation of laser-induced breakdown thresholds in ocular and aqueous media. II. Comparison to experiment," *IEEE J. Quantum Electron.* **31**, 2250–2257 (1995).
111. J. Noack and A. Vogel, "Laser-induced plasma formation in water at nanosecond to femtosecond time scales: calculation of thresholds, absorption coefficients, and energy density," *IEEE J. Quantum Electron.* **35**, 1156–1167 (1999).
112. C. B. Schaffer, A. Brodeur, and E. Mazur, "Laser-induced breakdown and damage in bulk transparent materials induced by tightly focused femtosecond laser pulses," *Meas. Sci. Technol.* **12**, 1784–1794 (2001).
113. E. N. Glezer, C. B. Schaffer, N. Nishimura, and E. Mazur, "Minimally disruptive laser-induced breakdown in water," *Opt. Lett.* **22**, 1817 (1997).
114. M. Duocastella, A. Patrascioiu, J. M. Fernández Pradas, J. L. Morenza Gil, and P. Serra Coromina, "Film-free laser forward printing of transparent and weakly absorbing liquids," *Opt. Express* 2010 Vol 18 P 21815-21825 (2010).
115. E. G. Gamaly, A. V. Rode, B. Luther-Davies, and V. T. Tikhonchuk, "Ablation of solids by femtosecond lasers: Ablation mechanism and ablation thresholds for metals and dielectrics," *Phys. Plasmas* **9**, 949 (2002).
116. M. D. Shirk and P. A. Molian, "A review of ultrashort pulsed laser ablation of materials," *J. Laser Appl.* **10**, 18 (1998).



117. M. Duocastella Solà, "Study of the laser forward transfer for the preparation of miniaturized biosensors," info:eu-repo/semantics/doctoralThesis, Universitat de Barcelona, Departament de Física Aplicada i Òptica (2010).
118. V. Dinca, A. Ranella, M. Farsari, D. Kafetzopoulos, M. Dinescu, A. Popescu, and C. Fotakis, "Quantification of the activity of biomolecules in microarrays obtained by direct laser transfer," *Biomed. Microdevices* **10**, 719–25 (2008).
119. N. Takizawa, K. Okano, T. Uwada, Y. Hosokawa, and H. Masuhara, "Viability evaluation of culture cells patterned by femtosecond laser-induced impulsive force," in S. L. Jacques, W. P. Roach, and R. J. Thomas, eds. (2008), pp. 685411–685411–6.
120. T. Kaji, S. Ito, H. Miyasaka, Y. Hosokawa, H. Masuhara, C. Shukunami, and Y. Hiraki, "Nondestructive micropatterning of living animal cells using focused femtosecond laser-induced impulsive force," *Appl. Phys. Lett.* **91**, 023904–3 (2007).
121. D. E. Hare, J. Franken, and D. D. Dlott, "Coherent Raman measurements of polymer thin-film pressure and temperature during picosecond laser ablation," *J. Appl. Phys.* **77**, 5950 (1995).
122. C. E. Brennen, *Cavitation and Bubble Dynamics* (Cambridge University Press, 1995).
123. A. Prosperetti, "A generalization of the Rayleigh–Plesset equation of bubble dynamics," *Phys. Fluids* **25**, 409 (1982).
124. L. Xiu-Mei, H. Jie, L. Jian, and N. Xiao-Wu, "Growth and collapse of laser-induced bubbles in glycerol–water mixtures," *Chin. Phys. B* **17**, 2574–2579 (2008).
125. S. T. Thoroddsen, K. Takehara, T. G. Etoh, and C.-D. Ohi, "Spray and microjets produced by focusing a laser pulse into a hemispherical drop," *Phys. Fluids* **21**, 112101 (2009).
126. C. Mézel, A. Souquet, J. Breil, D. Hébert, and F. Guillemot, "Self-consistent modeling of jet formation process in the nanosecond laser pulse regime," *Phys. Plasmas* **16**, 123112 (2009).
127. M. Duocastella, M. Colina, J. M. Fernandez-Pradas, P. Serra, and J. L. Morenza, "Study of the laser-induced forward transfer of liquids for laser bioprinting," *Appl. Surf. Sci.* **253**, 7855–7859 (2007).
128. A. Pearson, E. Cox, J. R. Blake, and S. R. Otto, "Bubble interactions near a free surface," *Eng. Anal. Bound. Elem.* **28**, 295–313 (2004).
129. P. B. Robinson, J. R. Blake, T. Kodama, A. Shima, and Y. Tomita, "Interaction of cavitation bubbles with a free surface," *J. Appl. Phys.* **89**, 8225–8237 (2001).
130. A. Patrascioiu, J. M. Fernández-Pradas, A. Palla-Papavlu, J. L. Morenza, and P. Serra, "Laser-generated liquid microjets: correlation between bubble dynamics and liquid ejection," *Microfluid. Nanofluidics* (2013).
131. J. R. Blake and D. C. Gibson, "Cavitation Bubbles Near Boundaries," *Annu. Rev. Fluid Mech.* **19**, 99–123 (1987).
132. J. R. Blake, M. C. Hooton, P. B. Robinson, and R. P. Tong, "Collapsing cavities, toroidal bubbles and jet impact," *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **355**, 537–550 (1997).
133. W. van Hoeve, S. Gekle, J. H. Snoeijer, M. Versluis, M. P. Brenner, and D. Lohse, "Breakup of diminutive Rayleigh jets," *Phys. Fluids* **22**, 122003 (2010).
134. J. M. Gordillo and M. Pérez-Saborid, "Aerodynamic effects in the break-up of liquid jets: on the first wind-induced break-up regime," *J. Fluid Mech.* **541**, 1 (2005).
135. Z. Zhang, R. Xiong, R. Mei, Y. Huang, and D. B. Chrisey, "Time-Resolved Imaging Study of Jetting Dynamics during Laser Printing of Viscoelastic Alginate Solutions," *Langmuir* **31**, 6447–6456 (2015).
136. K. K. Kuo, *Recent Advances In Spray Combustion: Spray Atomization and Drop Burning Phenomena* (AIAA, 1996).
137. Y. Lin, Y. Huang, G. Wang, T.-R. J. Tzeng, and D. B. Chrisey, "Effect of laser fluence on yeast cell viability in laser-assisted cell transfer," *J. Appl. Phys.* **106**, 043106 (2009).

138. O. Thoumine, A. Ott, and D. Louvard, "Critical centrifugal forces induce adhesion rupture or structural reorganization in cultured cells," *Cell Motil. Cytoskeleton* **33**, 276–287 (1996).
139. J. Eggers, "Nonlinear dynamics and breakup of free-surface flows," *Rev. Mod. Phys.* **69**, 865–930 (1997).
140. A. CASNER, "Déformations, manipulations et instabilités d'interfaces liquides induites par la pression de radiation d'une onde laser.," *Fluid Dynamics, Université Sciences et Technologies, Bordeaux I* (2002).
141. S. R. Coriell, S. C. Hardy, and M. R. Cordes, "Stability of liquid zones," *J. Colloid Interface Sci.* **60**, 126–136 (1977).
142. O. Vizika and D. A. Saville, "The electrohydrodynamic deformation of drops suspended in liquids in steady and oscillatory electric fields," *J. Fluid Mech.* **239**, 1 (1992).



## 2. Matériels et Méthodes expérimentales

*Ce second chapitre présente les moyens expérimentaux et les méthodes utilisées pendant la thèse. Les deux montages de bioimpression, avec et sans couche absorbante sont décrits ainsi que le dispositif d'imagerie Résolue en Temps (TRI), permettant d'obtenir des photographies des jets de bioencres produits par laser. Aussi, les moyens de caractérisation port-impression sont exposés. Enfin, les différents types de paramètres caractérisant les bioencres sont présentés.*

<b>2. Matériels et Méthodes expérimentales .....</b>	<b>55</b>
<b>2.1. Bioimprimante Modulab avec couche absorbante.....</b>	<b>57</b>
2.1.1. Description .....	57
2.1.2. Choix du laser .....	59
2.1.3. Préparation des échantillons .....	60
<b>2.2. Montage de bioimpression par LAB sans couche absorbante .....</b>	<b>65</b>
2.2.1. Description .....	65
2.2.2. Choix du laser .....	67
2.2.3. Adaptation du donneur sous forme de cuve .....	67
2.2.4. Préparation des échantillons .....	68
<b>2.3. Imagerie Résolue en Temps .....</b>	<b>71</b>
2.3.1. L'ombroscopie .....	71
2.3.2. Le montage général du TRI .....	72
2.3.3. Les différents montages expérimentaux .....	77
2.3.4. Calcul des vitesses et accélérations instantanées .....	79
<b>2.4. Caractérisation post-impression .....</b>	<b>81</b>
2.4.1. Bioimpression avec couche absorbante .....	81
2.4.2. Bioimpression sans couche absorbante .....	81
2.4.3. Nombre de répétitions des expériences de bioimpression .....	82
<b>2.5. Caractérisation des bioencres .....</b>	<b>84</b>
2.5.1. Viscosité .....	84
2.5.2. Tension de surface et densité .....	84
2.5.3. Spectres d'absorption .....	85
2.5.4. En résumé.....	85

## 2.1. Bioimprimante Modulab avec couche absorbante

---

### 2.1.1. Description

Le prototype MODULAB est unique, en particulier du fait de l'intégration d'un laser femtoseconde dans un système dédié à la biofabrication d'éléments biologiques. Il a été conçu par le Centre technologique Alphanov grâce à des fonds du laboratoire INSERM 1026 et de la région Aquitaine. Le prototype a été développé et finalisé au cours de la première partie de la thèse. Il a ensuite été déplacé dans les nouveaux locaux de la start-up Poietis dans la pépinière d'entreprise du Bioparc Bordeaux Métropole fin 2014. Du fait du développement de la start-up l'accès à la machine est devenu ensuite fortement limité (cf. Figure 24) et un autre montage expérimental a été utilisé.

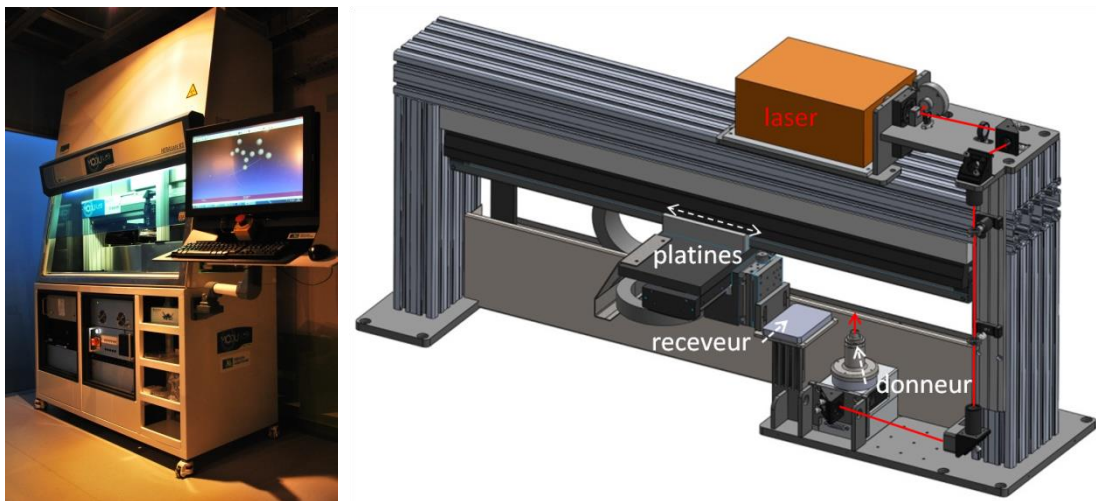


Figure 24 : Prototype MODULAB. à gauche: photo de la bioimprimante dans la hotte. à droite: schéma de la bioimprimante. Le trajet du laser est symbolisé par des lignes rouges.

Le prototype de bioimprimante comportait 3 éléments principaux : 1) un laser impulsif, 2) un système optique pour mener les impulsions à travers le montage puis les focaliser 3) deux substrats se faisant face. L'un des substrats est le « donneur », sur lequel les impulsions étaient focalisées et qui était recouvert du biomatériau à imprimer. On rappelle que le biomatériau est appelé bioencres dans le cas de la

bioimpression. Le second substrat est le « receveur » sur lequel la bioencres était imprimée (cf. Figure 25).

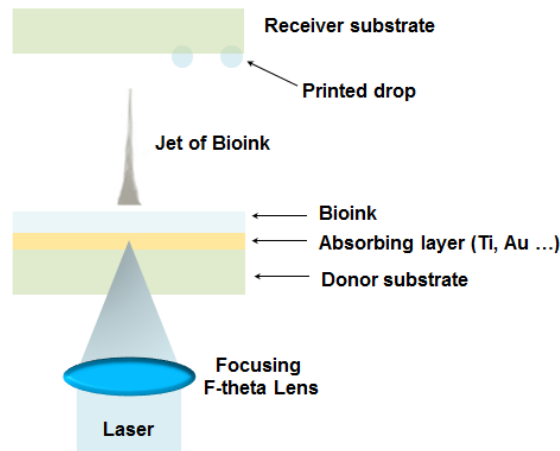


Figure 25 : Schéma de la bioimpression avec couche absorbante.

L'ensemble a été placé sous une hotte à flux laminaire afin d'éviter une contamination microbienne des échantillons biologiques et garantissait un environnement adapté à la culture cellulaire.

Parmi les éléments optiques, une lame demi-onde suivie d'un cube polarisé permettait de changer la puissance laser sur cible. En tournant la lame demi-onde, la polarisation de la radiation laser a été modifiée et donc la répartition de la puissance dans les polarisations linéaires « p » et « s » était modifiée. C'est la polarisation « p » de la radiation laser qui a été utilisée pour les expériences. Un agrandisseur de faisceau, avec un grossissement de 5, grossissait le faisceau jusqu'à un diamètre de 10 mm avant d'être focalisé par une lentille scanner f-theta. La lentille focalisait les impulsions laser à un diamètre de 10  $\mu\text{m}$  (diamètre d'Airy dans l'air) et avec une profondeur de champ de 150  $\mu\text{m}$  (dans l'air). De plus, des miroirs galvanométriques dirigeaient le laser à travers le scanner.

Un logiciel dédié permettait de créer sur demande des motifs en 2 ou 3 dimensions avec une précision de l'ordre des dimensions du faisceau au point focal. De plus, la position verticale du donneur était ajustée grâce à un système mécanique : en vissant le donneur on descendait sa position vers la lentille scanner. Le receveur était placé sur un système de platines de translation motorisées à 3 axes (Newport, USA) avec une précision d'un micron. Lors d'une impression, les platines se déplaçaient automatiquement au-dessus du donneur et suivaient les déplacements nécessaires à la réalisation du motif créé par ordinateur.

### 2.1.2. Choix du laser

Les caractéristiques du laser sont essentielles pour concevoir une bioimprimante: d'une part pour être adaptées à l'impression de biomatériaux ou de cellules et d'autre part pour permettre des impressions suffisamment rapides et reproductibles pour des applications de prototypage rapide.

- Longueur d'onde :

Elle a été choisie de façon à éviter l'altération des éléments biologiques. Devant la potentielle modification de l'ADN par les radiations UV [1], une longueur d'onde proche infra rouge a été préférée.

- Durée d'impulsion et cadence de répétition :

Une haute cadence de répétition permet de développer des procédés à haute vitesse. Ainsi des cadences de plusieurs centaines de kHz ont été choisies ici. La durée d'impulsion est de quelques centaines de femtosecondes. Elle permet une conversion « athermique » de l'énergie laser en énergie cinétique pour l'éjection du jet de liquide. En effet, la durée d'impulsion femtoseconde est inférieure au temps de diffusion des électrons excités et de transfert de leur énergie dans la matière (10 ps). La couche absorbante est vaporisée avant qu'il n'y ait diffusion de la chaleur hors du volume irradié. La zone affectée thermiquement existe mais elle est très faible en comparaison à des durées d'impulsions supérieures à 10ps.

- Qualité du faisceau :

Des paramètres tels que la divergence, le mode spatial TEM, le facteur de qualité du faisceau  $M^2$  et la stabilité énergétique des impulsions doivent être pris en compte pour assurer la reproductibilité, la stabilité et la haute résolution du système.

En résumé, le laser est un laser fibré (Satsuma LE, Amplitude Systemes, France) générant des impulsions à une longueur d'onde de 1030 nm avec des durées d'impulsion de 350 fs, une énergie par impulsion de 4  $\mu$ J sur cible (1,6W à 400kHz) avec un cadence de répétition de 200kHz à 1MHz (le maximum d'énergie était atteint pour une cadence de pulse picker de 400kHz) pour un facteur de qualité  $M^2$  de 1,1 donc un mode gaussien TEM<sub>00</sub>. La divergence est de 1,5 mrad, la stabilité énergétique des impulsions est de 0.4% RMS.



## 2.1.3. Préparation des échantillons

### 2.1.3.1. Préparation et choix des bioencres

- Composition et choix

La bioencre A, DMEM, est utilisée en biologie pour la culture cellulaire comme milieu de croissance pour maintenir la viabilité cellulaire. Elle a été utilisée comme première approche de l'impression de cellules car une telle bioencre contient un mélange de cellules et de milieu de culture. Les bioencres B et C ont été sélectionnées pour évaluer l'effet de la viscosité sur le procédé de bioimpression. Elles consistent en des solutions modèle, conçues pour créer une couche de liquide stable pendant une période temps suffisante. Des solutions similaires ont déjà été utilisées par notre groupe de recherche [2–4].

La bioencre B contenait 90% en rapport volume/volume (v/v) d'eau distillée, 10% (v/v) de glycérol (Glycérol RP, Normapur, Paris, France) et 15 mg/ml de sérum bovin (BSA fraction V, Eurobio, France). La bioencre C contenait les mêmes composants avec en plus 1% en rapport poids/volume (w/v) d'alginate de sodium (Protanal 10/60, FMC Biopolymer, et eau déionisée).

Le glycérol a été ajouté pour augmenter la température d'évaporation de la bioencre. L'alginate de sodium (cf. Annexe A) permettait de varier la viscosité de la bioencre. Le surfactant BSA permet d'améliorer l'étalement de la bioencre.

- En résumé

Les compositions des différentes bioencres utilisées sont résumées ci-dessous Tableau 2-1:

Tableau 2-1 : Composition des bioencres pour la bioimpression avec couche absorbante.

Bioencre	Composition
A	Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM)
B	90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 15mg/ml d'albumine de sérum bovin
C	1% (w/v) sodium alginate + 90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 15mg/ml d'albumine de sérum bovin

### 2.1.3.2. Préparation de la bioencre chargée en cellules

- Composition et choix

La bioencre D contenait des cellules kératinocytes de lignée HaCaT à une concentration de 100 millions/mL avec du DMEM. Ces cellules constituent la couche superficielle de la peau et des phanères. La concentration cellulaire a été choisie de telle sorte que les cellules dans la bioencre soient jointives (« tapis cellulaire »). Ceci permettait d'augmenter la probabilité qu'un tir laser atteigne une cellule, car elles tapissent en tous points la surface du donneur.

- En résumé

La composition de la bioencre utilisée est résumée ci-dessous :

Tableau 2-2 : Composition de la bioencre cellulaire.

Bioencre	Composition
D	Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) + cellules kératinocytes de lignée HaCaT (100 millions/ml)

- Culture cellulaire

Les cellules HaCaT étaient cultivées avec du DMEM (DMEM, Lifetechnologies, USA) supplémentées avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS, Dutscher, France) et 1% d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine, amphotéricine, PAN-Biotech, Allemagne), sous atmosphère contrôlée (100% d'humidité, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Le milieu de culture était changé tous les jours.

- Préparation de la bioencre chargée en cellules

Les cellules ont été détachées du récipient en plastique avec de la trypsine concentrée à 0,025% (w/v) durant 5 min à 37°C. Les cellules ont ensuite été suspendues dans un volume approprié de DMEM à une concentration de 100 million de cellules/ml.

### 2.1.3.3. Choix de la couche absorbante

Le donneur était composé des 3 éléments : le substrat transparent à la longueur d'onde laser, une fine couche absorbant l'énergie laser et la bioencres liquide. L'or a été choisi comme matériau absorbant car il est biocompatible, tout comme le titane ou le platine. L'avantage de l'or sur ces autres métaux est qu'il ne s'oxyde pas avec le temps. Ainsi, les éventuels débris métalliques déposés lors de l'impression ne devraient pas affecter la viabilité cellulaire de part leur composition chimique. Le coefficient d'absorption  $A$  est défini par les équations de Fresnel [5]:

$$A(\lambda) = 1 - R = \frac{4n}{(n + 1)^2 + k^2} \quad (2-1)$$

Avec  $\lambda$ , la longueur d'onde

$R$ , le coefficient de réflexion du métal

$n$ , la partie réelle de l'indice de réfraction complexe

$k$ , la partie imaginaire de l'indice de réfraction complexe

La profondeur de peau ou la longueur de pénétration, est la longueur sur laquelle l'onde laser est absorbée. Elle est définie par la relation :

$$\delta = \frac{\lambda}{2\pi k} \quad (2-2)$$

L'énergie d'absorbée dépend du matériau et de la longueur d'onde utilisés. Les propriétés optiques de l'or à la longueur d'onde laser infra-rouge de la bioimprimante sont résumées Tableau 2-3. L'or absorbe moins de 1 % du rayonnement reçu dans l'infra-rouge. Aussi, l'épaisseur de la couche d'or devra être au moins égale à  $\delta$  pour être efficiente.

Tableau 2-3 : Propriétés optiques de l'or à 1030 nm.

$\lambda$ (nm)	$n$	$k$	$A(\%)$	$R(\%)$	$\delta$ (nm)
1030	0,1	6,54	0,91	99,09	25

### 2.1.3.4. Dépôt de la couche absorbante

Les substrats donneurs étaient constitués de lames de verre (verre B270i, SCHOTT, Allemagne) qui ont été recouvertes d'une couche absorbante d'or d'épaisseur d'environ 50 nm par évaporation thermique sous vide avec un métalliseur (EMSCOPE SC500, Royaume-Uni). Le temps de dépôt utilisé était de 2 minutes. L'épaisseur a été mesurée sur un profilomètre optique confocal DCM3D (Leica Microsystems, France).

Après utilisation, les lames étaient nettoyées avec un détergent vaisselle commercial, rincée à l'eau puis séchées avec du papier absorbant.

### 2.1.3.5. Dépôt de la bioencres

La bioencres était déposée et étalée en film mince avec l'embout d'une pipette micrométrique sur les substrats donneurs avec la couche d'or. Afin de contrôler l'épaisseur de bioencres, le volume  $V$  nécessaire à l'obtention d'une épaisseur  $\varepsilon$  était déposé sur le substrat donneur. Le volume vaut  $V = S \times \varepsilon$ , avec  $S$  la surface du donneur. Le donneur était un disque de rayon  $r = 7,45$  mm donc :

$$V = \pi r^2 \times \varepsilon \quad (2-3)$$

$$V_{(\mu L)} \approx 0,174 \times \varepsilon_{(\mu m)} \quad (2-4)$$

Ainsi, pour une épaisseur  $\varepsilon = 40 \mu m$  le volume vaut  $V = 7 \mu L$ .

### 2.1.3.6. Substrat receveur

Les substrats receveurs étaient :

- soit des substrats de quartz stérilisés et recouverts de collagène de type 1 (Dutscher, France) concentré à 2% (v/v) en DMEM sous conditions stériles, pour les expériences d'impression de cellules. Un volume approprié de bioencres de collagène était étalé sur les substrats receveur de façon à obtenir une épaisseur de 200  $\mu m$ . Puis, le collagène reposait pendant 30 min à 37 °C avant de réaliser les expériences d'impression.
- soit des puits de culture cellulaires (plaque 6 puits, Nunclon Vita, Thermo Scientific, USA), pour les expériences d'impression de bioencres modèle de biomolécules.

### **2.1.3.7. Distance de transfert**

La distance de transfert, entre le substrat receveur et le donneur, a été maintenue à 1 mm grâce à la platine motorisée du receveur. Ce petit espacement était possible car le substrat donneur entraînait dans les puits de culture cellulaire du substrat receveur. De plus, le réglage de la distance de transfert était réalisé grâce à une tare à partir d'un espacement nul entre donneur et receveur. L'espacement nul correspondait à une position du receveur et était déterminé expérimentalement par le contact mécanique entre les deux substrats. Pour les substrats de quartz stérilisés et recouverts de collagène, nous avons déterminé le contact mécanique entre donneur et substrat de quartz receveur sans collagène. Puis, l'épaisseur de collagène, supposée constante, était prise en compte pour régler l'espacement entre donneur et receveur.

## 2.2. Montage de bioimpression par LAB sans couche absorbante

---

### 2.2.1. Description

Le montage expérimental de bioimpression sans couche absorbante est représenté Figure 26. Il regroupe 1) un système de génération des impulsions laser et 2) un système de bioimpression. Le système de génération des impulsions laser comprenait une source laser pulsée femtoseconde, un générateur de délais avec une précision de l'ordre de la picoseconde (DG645, Stanford Research Systems, Optoprim, France) permettant de déclencher une impulsion laser et un ensemble d'optiques menant le laser jusqu'au donneur et réalisant des mises en forme du faisceau. Les branchements et réglages du générateur de délais sont résumés en Annexe B.

Une lame demi-onde combinée à un cube polariseur diviseur de faisceau permettait de varier l'énergie sur cible (sur le donneur). Après le cube diviseur de faisceau, nous avons utilisé la radiation laser polarisée p sur le chemin optique pour le montage de bioimpression. Deux systèmes afocaux étaient placés derrière le diviseur de faisceau : le premier était un afocal cylindrique avec un grandissement de 1,5. Le but était de réaliser de la mise en forme de faisceau pour passer d'une distribution d'intensité spatiale elliptique du faisceau à une distribution circulaire. Le second afocal Galiléen grossissait le diamètre du faisceau avec un grandissement de 4 pour recouvrir complètement le plus grand diamètre de pupille des objectifs de microscope utilisés. L'objectif de microscope monté focalisait le faisceau sur le substrat donneur.

Les caractéristiques des différents objectifs (Plan Apo NIR-infinity corrected-objective, Mitutoyo, Japon) sont résumées ci-dessous :

Tableau 2-4 : Caractéristiques des objectifs de microscope utilisés.

Grossissement de l'objectif	Ouverture numérique	Profondeur de champs ( $\mu\text{m}$ , dans l'air)	Rayon d'Airy ( $\mu\text{m}$ , dans l'air)
10x	0,26	$\pm 9,3$	2,4
20x	0,4	$\pm 4$	1,6
100x	0,7	$\pm 1,3$	0,9

Une platine de translation micrométrique (M-UMR8.25 avec un actionneur micrométrique BM17.25, Newport, USA) permettait de régler la position de l'objectif dans la direction de propagation du laser avant de réaliser les expériences avec une précision longitudinale de 10  $\mu\text{m}$ . Ce critère sur la position de l'objectif est tel que le jet de la bioencre doit être le plus haut pour une condition de bioimpression et 30  $\mu\text{s}$  après l'impulsion laser. Donc, le laser est focalisé proche de la surface libre de la bioencre [6,7].

Le système de bioimpression regroupe 1) un substrat donneur, sur lequel les impulsions sont focalisées et qui est recouvert de la bioencre à imprimer, 2) un substrat receveur sur lequel la bioencre est imprimée. Le substrat receveur était ici une cuve (cf. Figure 26).

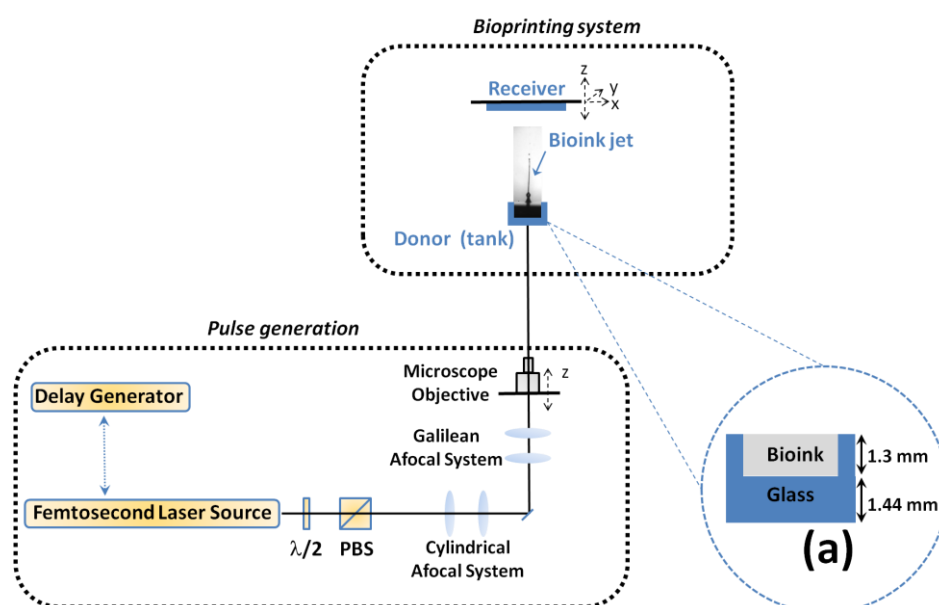


Figure 26 : Schéma du montage expérimental de bioimpression sans couche absorbante et du montage d'imagerie résolue en temps (TRI). PBS: cube polariseur diviseur de faisceau. Encart (a), principales dimensions du substrat donneur.

### 2.2.2. Choix du laser

Comme vu précédemment au 2.1.2, les caractéristiques du laser sont essentielles pour créer un montage de bioimpression assistée par laser.

Des caractéristiques similaires au laser du prototype MODULAB ont été choisies, pour les raisons évoquées précédemment en 2.2.2 : une longueur d'onde infra-rouge, une cadence de répétition élevée (kHz), une durée d'impulsion femtoseconde.

En résumé, le laser est une source femtoseconde S-Pulse (AMPLITUDE SYSTEMES) avec des durées d'impulsion de 800 fs et une longueur d'onde de 1030 nm. L'énergie d'impulsion était de 34 ou 257  $\mu$ J sur le donneur (800 mW à 10 kHz et 600 mW à 1 kHz) et le taux de répétition s'étendait de 1 à 10 kHz. Le facteur de qualité  $M^2$  n'était pas mesuré à l'époque de construction du laser, cependant le profil du faisceau a été qualifié ci dessous avec une caméra (TaperCamD-UCD23, DataRay Inc., USA). On observe l'ellipticité du faisceau et un mode gaussien  $TEM_{00}$ . La divergence est de 2 mrad, la stabilité énergétique des impulsions est de 1.7% RMS (sur 18h).

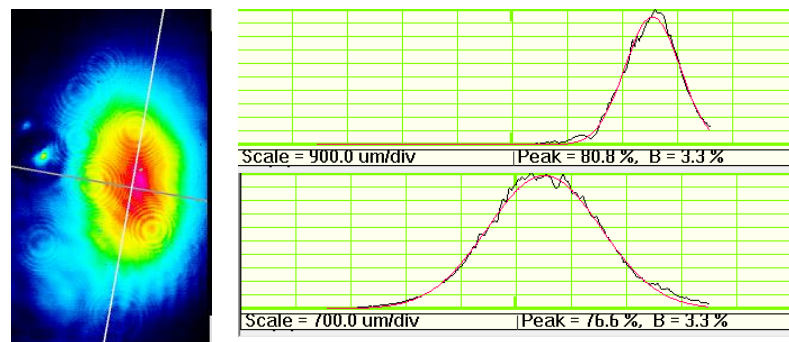


Figure 27 : Profil du faisceau laser S PULSE en sortie laser.

### 2.2.3. Adaptation du donneur sous forme de cuve

Le substrat donneur (voir encart (a) Figure 26) consiste en une lame de verre de microscope sur laquelle une rondelle métallique a été collée. Ce donneur formait une



« cuve » de 1,26 mm de haut avec un diamètre interne de 14 mm et contenait jusqu'à 129  $\mu$ L de bioencres.

L'avantage d'utiliser cette cuve est d'obtenir une évaporation homogène sur la surface libre de la bioencres, contrairement à un film fin de bioencres où l'évaporation varie d'une position à l'autre. Ainsi, avec cette cuve donneuse, nous avons amélioré un aspect pratique du procédé : si l'épaisseur de la bioencres a diminué à cause de l'évaporation, il n'y a pas besoin de changer de donneur avant de lancer une nouvelle impression. L'opérateur doit simplement ajuster la position de l'objectif de microscope par rapport au niveau de bioencres pour imprimer (afin d'ajuster la focalisation).

## 2.2.4. Préparation des échantillons

### 2.2.4.1. Préparation et choix des bioencres

- Composition et choix

De la même façon qu'au paragraphe 2.1.3, différentes bioencres ont été sélectionnées.

La bioencres A, DMEM, milieu de culture cellulaire pour la biologie, a été utilisée comme solution « modèle » de l'impression de cellules car une telle bioencres contient un mélange de cellules et de milieu de culture. Les bioencres B et E ont été sélectionnées pour évaluer l'effet de la viscosité sur le procédé de bioimpression. La bioencres E a été employée à la place de la bioencres C du procédé avec couche absorbante (cf. 2.1.3) afin de pouvoir comparer l'impression sans couche absorbante à 800 fs avec des impressions réalisées à des durées d'impulsion sub-nanosecondes par l'équipe INSERM. Les bioencres consistent en des solutions modèle, conçues pour créer une couche de liquide stable pendant une période temps suffisante. Des solutions similaires ont déjà été utilisées par notre groupe de recherche pour des travaux antérieurs [2–4].

La bioencres B contenait 90% en rapport volume/volume (v/v) d'eau distillée, 10% (v/v) de glycérol (Glycérol RP, Normapur, Paris, France) et 15 mg/ml de sérum bovin (BSA fraction V, Eurobio, France). La bioencres E contenait les mêmes composants avec en plus 1% en rapport poids/volume (w/v) d'alginate de sodium (Protanal 10/60, FMC Biopolymer, et eau déionisée) et le sérum bovin était remplacé par 2 mg/ml de dodécylsulfate de sodium (436143 - Sodium dodecyl sulfate, Sigma-aldrich, USA).

Le glycérol était ajouté pour augmenter la température d'évaporation de la bioencres. L'alginate de sodium (cf. Annexe A) permettait de faire varier la viscosité de la bioencres. Le surfactant SDS permettait d'améliorer l'étalement de la bioencres.

- En résumé

Les compositions des bioencres utilisées sont résumées ci-dessous :

Tableau 2-5 : Composition des bioencres pour la bioimpression sans couche absorbante.

Bioencres	Composition
A	Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM)
B	90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 15mg/ml d'albumine de sérum bovin
E	1% (w/v) sodium alginate + 90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 2mg/ml de dodécylsulfate de sodium (SDS)

#### 2.2.4.2. Dépôt de la bioencres

La bioencres était déposée dans la cuve donneuse avec l'embout d'une pipette de volume 1 ml de façon à la remplir complètement. Le remplissage de la cuve était contrôlé par diagnostic visuel à l'aide d'une image en temps réel donnée par la caméra du système d'imagerie résolue en temps (TRI).

#### 2.2.4.3. Substrat receveur

Le substrat receveur consistait en une lame de verre de microscope (Lames S1, LABO MODERNE, France) qui était positionné précisément avec un système de platines de translation XZ (M-105.10, Physik Instrumente, Allemagne et M-UMR3.5 avec actionneur micrométrique DM11 5, Newport, USA) avec une précision longitudinale de 20  $\mu\text{m}$  et une précision verticale de 10  $\mu\text{m}$ .

#### **2.2.4.4. Distance de transfert**

La distance entre le receveur et le substrat donneur (i.e. la distance de transfert) a été déterminée en mesurant la distance entre la position de contact des deux substrats et la position de bioimpression du receveur par une translation en Z avec le système de platines.

Dans cette étude, on a défini la distance de transfert comme la hauteur maximale du jet mesuré ( $h_{\max}$ ) correspondant à une condition expérimentale comprenant le type de bioencres, l'énergie laser et l'ouverture numérique (ON) utilisée pour la focalisation du faisceau dans la bioencres.

## 2.3. Imagerie Résolue en Temps

---

L'imagerie résolue en temps (TRI) permettait d'observer la formation du jet de bioencres lors de l'impression afin de mieux comprendre les mécanismes qui en découlent. C'est une technique basée sur le principe de l'ombroscopie.

### 2.3.1. L'ombroscopie

L'ombroscopie est une méthode optique qui permet de visualiser les non-uniformités d'un objet transparent. Le principe est d'éclairer un objet transparent et d'observer un écran placé dans l'ombre de cet objet. Si la source lumineuse est suffisamment petite, et si l'objet observé présente des variations locales d'indice (solide, liquide ou gaz), celles-ci sont repérables par ombroscopie. Ces gradients peuvent être statiques (non-uniformités dans le verre) aussi bien que dynamiques (variations de pression, de densité, de composition, ou de températures dans les liquides).

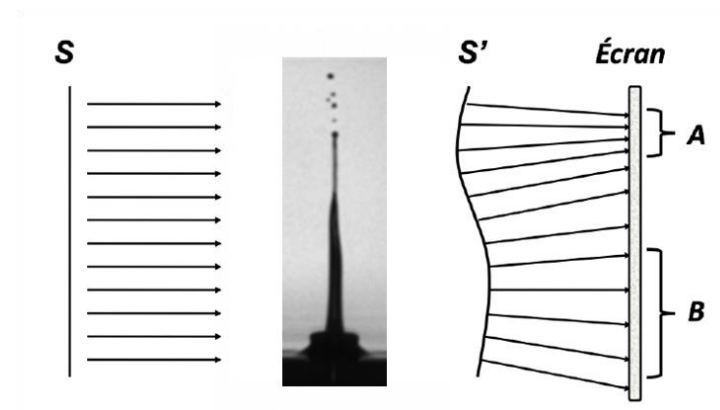


Figure 28 : Principe de l'ombroscopie.

Les variations d'indice entraînent des variations locales d'éclairement visibles sur l'écran. En effet, les rayons lumineux de la source, initialement parallèles, sont déviés après passage à travers l'objet. Ceci s'explique par la déformation de l'onde lumineuse sortant de l'objet  $S'$  par les gradients latéraux d'indice. A une position où la courbure de l'onde est dirigée vers la source, les rayons de lumière divergent vont

occuper une aire plus large sur l'écran, comparé à l'objet et cette diffusion diminue la luminosité (zone B, Figure 28). A l'inverse, si la courbure de l'onde est tournée vers l'écran, les rayons lumineux vont se concentrer, et résulter en une aire plus brillante, si l'écran n'est pas placé trop loin (zone A, Figure 28). Ainsi, on observe un phénomène en amplitude sur l'écran.

Dans notre cas, la source lumineuse était une diode laser pulsée et l'écran était remplacé par une caméra CCD connectée à un ordinateur affichant l'image.

### 2.3.2. Le montage général du TRI

La dynamique de la bioencre pendant la bioimpression était observée grâce à un montage d'imagerie résolue en temps (TRI) avec une résolution temporelle de 30 ns.

L'installation a été décrite dans une étude précédente [8] et elle est schématisée sur la Figure 29. Le système consistait en une diode laser pulsée à une longueur d'onde de 810 nm pour une durée d'impulsion de 30 ns (Cavitar, R&D Vision, France), une caméra CCD de résolution 1038x1388 pixels (Stingray, AVT, R&D Vision, France) avec un zoom optique (Zoom Macro Navitar, R&D Vision, France). Un générateur de retard (DG645, Stanford Research Systems, USA) déclenchait l'impulsion laser du LAB et gérant le délai entre le laser du LAB et l'éclairement de la diode. L'éclairement de la diode à un instant donné permettait la capture d'image par la caméra. Le montage du TRI était installé sur le montage de bioimpression afin d'acquérir des images de jets de bioencre en vue latérale. Les branchements et réglages du générateur de délais sont résumés en Annexe B et la procédure d'utilisation du logiciel Hiris contrôlant la caméra est présentée en Annexe C.

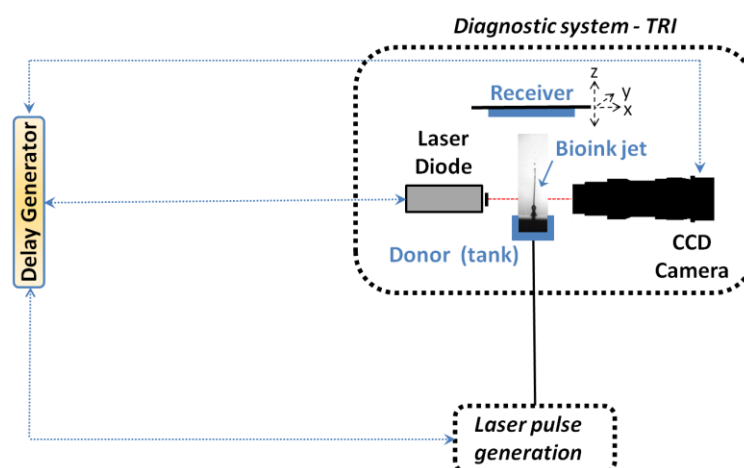


Figure 29 : Montage général du TRI.

### 2.3.2.1. L'échelle de mesure

L'échelle de mesure sur l'image TRI a été calculée en fonction du zoom optique utilisé sur la caméra. Puis, une mesure de vérification a été réalisée avec un objet fin (fibre optique de 125  $\mu\text{m}$  d'épaisseur).

Deux zooms sont compris dans la caméra :

- un zoom interne de x3,5
- un zoom variable (molette ajustable) de : x0,7 à x2

Aussi, la résolution de l'image est de 1038 x 1388 pixels.

L'échelle était calculée avec un produit en croix et à partir de l'échelle 1 (1  $\mu\text{m}$ /pixel) sur l'image pour un zoom total x4,9.

Tableau 2-6 : Calculs d'échelle pour les images TRI en fonction du zoom ajustable de la caméra.

Zoom ajustable	Zoom total	X ( $\mu\text{m}$ )	Y ( $\mu\text{m}$ )	Echelle ( $\mu\text{m}/\text{pix}$ )
x1,4	4,9	1038	1388	1
x0,7	2,5	2076	2776	2
x1	3,5	1453,2	1943,2	1,4
x1,5	5,3	968,8	1295,5	0,9

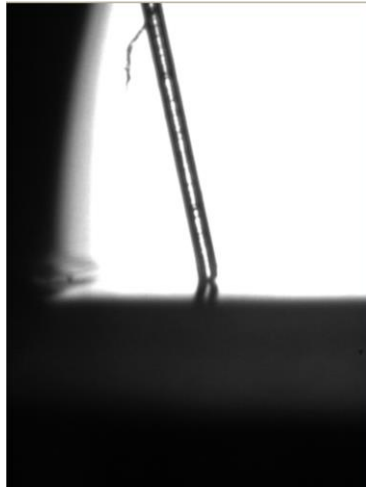


Figure 30 : Vérification de la calibration avec une fibre optique d'épaisseur connue.

### 2.3.2.2. Le délai

Le délai temporel  $\Delta t$  entre l'impulsion laser femtoseconde, déclenchant un jet de liquide, et l'illumination du phénomène était géré par le générateur de délais. Chaque image acquise correspondait à un tir laser femtoseconde. Le générateur permettait de lancer une séquence préalablement programmée (cf. Figure 31): la caméra était synchronisée avec le signal de synchronisation et était déclenchée à  $t=0$ , puis le tir laser femtoseconde était libéré pour  $t > 500 \mu s$  (si  $t < 500 \mu s$  la caméra n'acquiert pas d'image), enfin la diode illuminait la scène.

La synchronisation des différents signaux sur un signal externe était nécessaire afin de savoir de façon reproductible à quel temps après le tir laser femtoseconde une image avait été prise par la caméra. Ce signal de synchronisation provenait du laser femtoseconde sur les deux montages de bioimpression (signal du pulse picker). La synchronisation du signal du pulse picker et des impulsions laser a été vérifiée en comparant le signal pulse picker et celui d'une photodiode placée au niveau du donneur de bioimpression.

Le signal AB du laser femtoseconde démarrait ainsi à  $t = N \times \Delta T$ , avec  $N$  un entier naturel et  $T$  période du signal pulse picker.

Aussi, la durée du signal du laser femtoseconde devait être inférieure à  $\Delta T$  pour ne libérer qu'une impulsion femtoseconde.

Par exemple :

Pour  $1/\Delta T = 400 \text{ kHz}$ ,  $\Delta T = 2,5 \mu s$  et pour avoir  $t > 500 \mu s$  il faut  $N = 200$  ( $t = 200 \times 2,5 = 500 \mu s$ ).

Pour  $1/\Delta T = 10 \text{ kHz}$ ,  $\Delta T = 100 \mu\text{s}$  et pour avoir  $t > 500 \mu\text{s}$  il faut  $N=5$  ( $t = 5 \times 100 = 500 \mu\text{s}$ ).

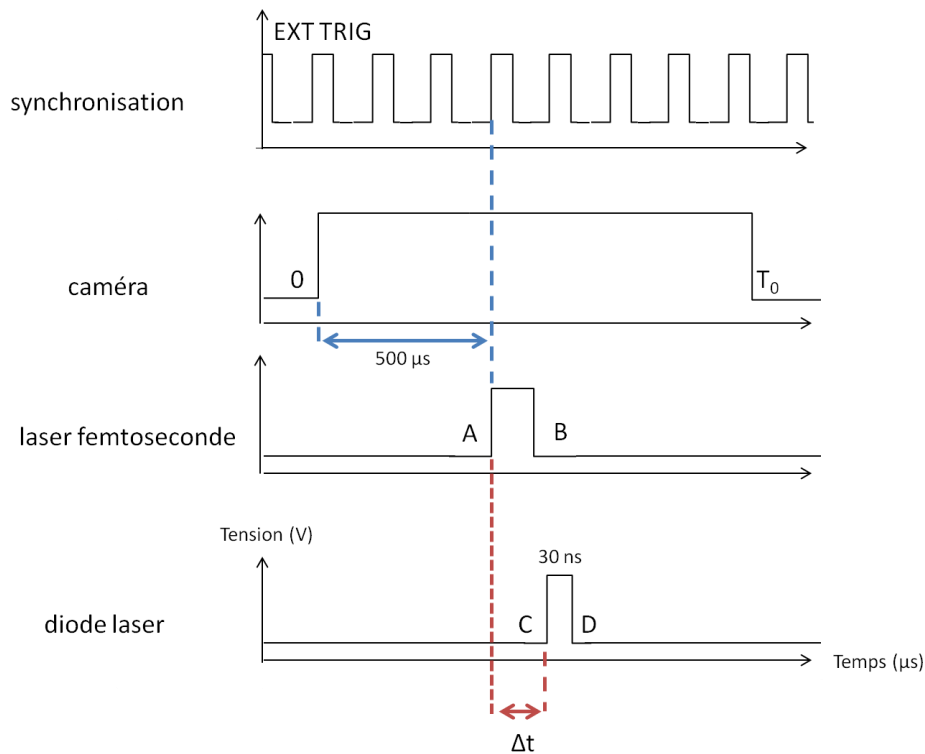


Figure 31 : Signaux gérés par le générateur de délais.

### 2.3.2.3. Mesure de la hauteur des jets

Pour l'analyse de la hauteur des jets, un logiciel dédié d'analyse, réalisé par le laboratoire CELIA, a été utilisé sur les photos TRI (cf. Annexe D). Nous avons mesuré la distance entre la base du jet (à la surface libre de la bioencore) jusqu'à ce que la première interruption de celui-ci en gouttes. Ainsi, nous avons pris en compte dans nos mesures la partie continue du jet (des exemples de jets peuvent être vus Figure 32).



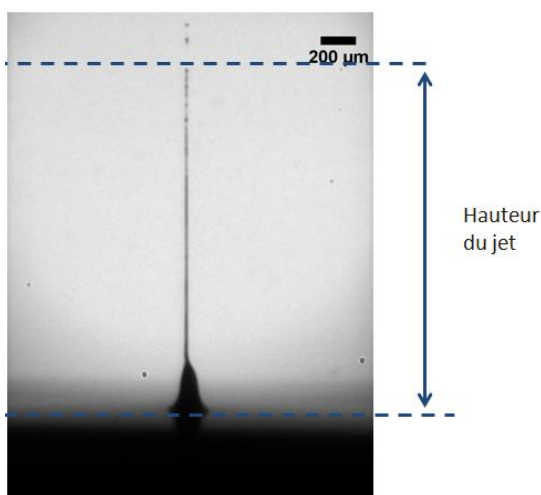


Figure 32 : Mesure de la hauteur du jet.

#### 2.3.2.4. Nombre de répétitions des expériences de TRI

Le nombre de répétitions des expériences de TRI, qui a été utilisé pour les deux procédés de bioimpression est résumé ci-dessous, pour les jets de bioencre observés par TRI.

La morphologie des jets a été observée pour la bioimpression avec couche absorbante avec une prise d'images simples par la caméra (cf. Annexe C). Ce type de fonctionnement de la caméra ne permettant pas de reproduire rapidement des expériences de TRI (*i.e.* il demande à spécifier où enregistrer chaque image après chaque prise), il explique le plus faible nombre de répétitions dans le cas de la bioimpression avec couche absorbante. De plus, la hauteur des jets a été évaluée avec une prise d'images multiples par la caméra (cf. Annexe C). Plusieurs mesures de hauteur de jet ayant été réalisées, la donnée en sortie d'expérience était une hauteur moyenne.

Tableau 2-7 : Nombre de répétitions des expériences de TRI. Bioimpression avec couche absorbante.

Bioencre	Composition	Répétitions des expériences
A	Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM)	5

B	90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 15mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA)	5
C	1% (w/v) sodium alginate + 90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 15mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA)	5

Tableau 2-8 : Nombre de répétitions des expériences de TRI. Bioimpression sans couche absorbante.

Bioencore	Composition	Répétitions des expériences
A	Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM)	10
B	90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 15mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA)	10
E	1% (w/v) sodium alginate + 90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 2mg/ml de dodécylsulfate de sodium (SDS)	10

### 2.3.3. Les différents montages expérimentaux

#### 2.3.3.1. Montage pour la bioimpression avec couche absorbante

Le montage de TRI a été adapté sur le prototype de bioimpression MODULAB. En effet, un montage spécifique était nécessaire afin, d'une part, de respecter les dimensions disponibles dans le prototype pour placer le TRI, d'autre part, de créer un montage mobile, capable d'être retiré régulièrement du prototype lors des bioimpressions, puis d'être replacé dans l'enceinte du prototype MODULAB. Un schéma du montage de TRI réalisé est visible Figure 33. Un portoir spécifique pour la caméra a de plus été réalisé pour assurer sa stabilité. De plus, un système de cage a été employé afin de relier la caméra à la diode de façon à les conserver alignées lors du déplacement du montage TRI. L'insertion de ce montage dans le prototype MODULAB

est présenté Figure 34. Les platines du donneur étaient déplacées à l'extrémité gauche du prototype de façon à libérer un espace pour positionner la caméra.

Ce montage entraînait cependant une forte flèche qui tendait à incliner la diode sous son poids. Un support opto-mécanique (porte-tige) a alors été utilisé pour redresser la diode afin qu'elle soit dans l'axe de la caméra.

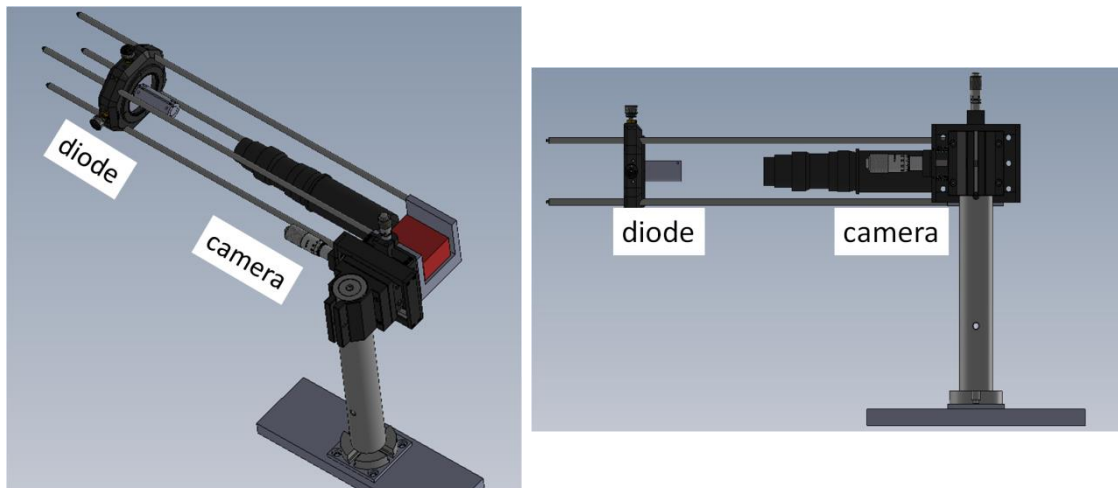


Figure 33 : Montage de TRI développé pour l'utilisation avec le prototype de bioimpression MODULAB.

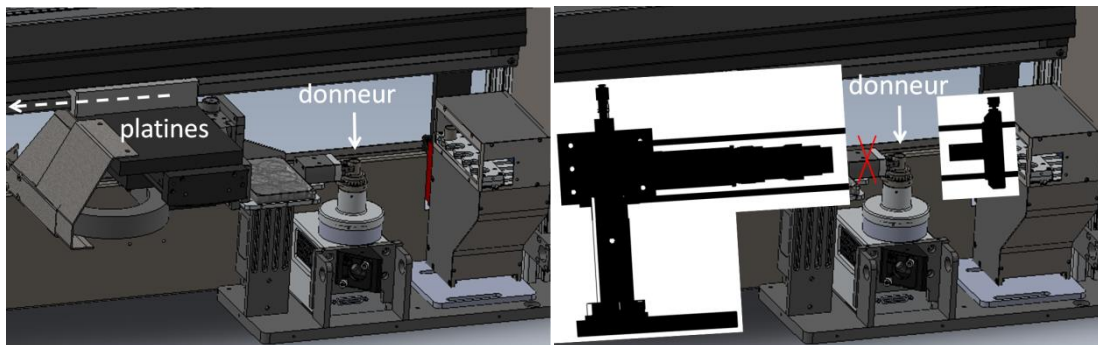


Figure 34 : Géométrie de l'espace disponible pour le TRI dans le prototype MODULAB (gauche). Montage du TRI dans le prototype (droite).

### 2.3.3.2. Montage pour la bioimpression sans couche absorbante

Le montage expérimental d'imagerie résolue en temps (TRI) est représenté Figure 35. Un profilé aluminium maintenait le microscope, le donneur et le receveur. Un miroir permettait de « faire monter » le faisceau jusque dans le microscope (« miroir

ascenseur »). Des éléments opto-mécaniques maintenaient la caméra et la diode face à face.

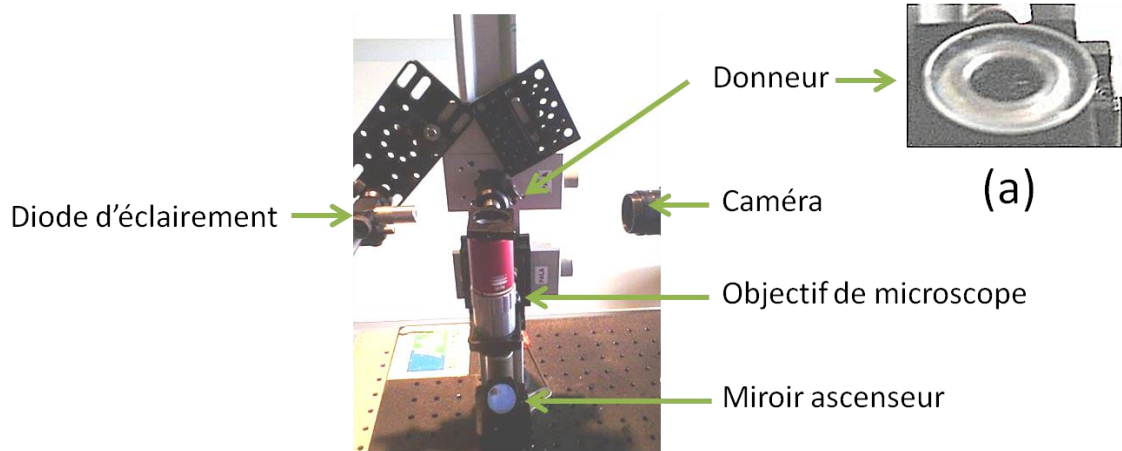


Figure 35 : Montage de TRI pour la bioimpression sans couche absorbante. Encart (a): donneur.

### 2.3.4. Calcul des vitesses et accélérations instantanées

Les vitesses et les accélérations instantanées ont été calculées à partir des hauteurs de jets sur les images de TRI.

Elles ont été calculées comme suit :

$$v_i = \frac{h_{i+1} - h_{i-1}}{t_{i+1} - t_{i-1}} \quad (2.3.4.1)$$

$$a_i = \frac{v_{i+1} - v_{i-1}}{t_{i+1} - t_{i-1}} \quad (2.3.4.2)$$

Avec  $v$ , la vitesse instantanée

$a$ , accélération instantanée

$t$ , temps d'observation

$i$ , l'indice temporel de la grandeur instantanée (*i.e.*  $v_i = v(t_i)$ )

Les vitesses ou accélérations négatives indiquent un changement d'évolution du jet : le jet diminue après avoir grandi et le jet décélère après avoir accéléré.

L'incertitude sur les vitesses et les accélérations résulte des incertitudes sur les hauteurs mesurées :

$$\Delta v = \frac{t\Delta h}{t^2} + \frac{h\Delta t}{t^2} = \frac{t\Delta h}{t^2} = \frac{\Delta h}{t} \quad (2.3.4.3)$$

$$\Delta a = \frac{v\Delta t}{t^2} + \frac{t\Delta v}{t^2} = \frac{t\Delta v}{t^2} = \frac{\Delta v}{t} \quad (2.3.4.4)$$

Avec  $\Delta t = 0$ , on néglige l'incertitude temporelle car le générateur de délais a une précision de l'ordre de la picoseconde ( $\gg$  aux temps des expériences en microsecondes).

## 2.4. Caractérisation post-impression

---

### 2.4.1. Bioimpression avec couche absorbante

#### 2.4.1.1. Mesure des diamètres imprimés

Les diamètres des gouttes imprimées sur le substrat receveur ont été mesurés avec un microscope optique inversé (Nikon Optiphot-2, Japon) équipé d'une caméra vidéo couleur (Sony Power HAD 3CCD, Japon) et doté d'un logiciel dédié (Matrox Intellicam, Canada).

#### 2.4.1.2. Test de survie cellulaire (Live/dead) pour la bioencres D

Les substrats receveurs de la bioencres D ont été observés 24 h après chaque expérience avec un microscope Nikon Eclipse 80i (Nikon Métrologie, France) équipé de caméra digitale Dxm1200C et le jeu de filtre suivant: calcéine : Ex 465–495nm/DM: 505 nm/EM: 515–555 nm; and EthD-1: Ex 540–580nm/DM: 595 nm/EM: 600–660 nm. Les images ont été analysées avec le logiciel NIS-Elements 3.0 AR.

### 2.4.2. Bioimpression sans couche absorbante

#### 2.4.2.1. Mesure des diamètres imprimés

Les diamètres de gouttes ont été mesurés sur le receveur, avec un microscope optique de mesure (MF-A1010/H, MITUTOYO, Japon) équipé d'une unité de traitement des données fournissant une résolution de mesure jusqu'à 1 nm et une précision de mesure allant jusqu'à 1 µm.

En outre, le diamètre de la goutte imprimée a été évalué par plusieurs mesures. Ainsi, la donnée en sortie d'expérience était un diamètre moyen imprimé.

### 2.4.2.2. Calcul du volume de gouttes

Le volume de gouttes a été calculé sur l'hypothèse d'une goutte hémisphérique :

$$V = \frac{2}{3} \pi h \frac{d^2}{2^2} \quad (2.4.2.2.1)$$

L'incertitude sur le volume résulte des incertitudes sur les hauteurs et diamètres de gouttes mesurées :

$$\Delta V = \frac{1}{3} \pi (h \times d \times \Delta d + d^2 \Delta h) \quad (2.4.2.2.2)$$

Avec

- V, le volume de gouttes
- $\Delta V$ , l'incertitude sur le volume de gouttes
- h, la hauteur de gouttes
- $\Delta h$ , l'incertitude sur la hauteur de gouttes
- d, le diamètre de gouttes
- $\Delta d$ , l'incertitude sur le diamètre de gouttes

Les hauteurs de gouttes sont extraites d'images résolues en temps lors de l'impression sur un receveur. L'expérience a été répétée 3 fois.

### 2.4.3. Nombre de répétitions des expériences de bioimpression

Le nombre de répétitions des expériences de bioimpression, qui a été utilisé pour les deux procédés (avec et sans couche absorbante) est résumé ci-dessous, pour les diamètres de gouttes imprimées. Le prototype de bioimpression avec couche absorbante permettait un plus grand nombre de répétitions grâce à l'impression assistée par ordinateur et au scanner optique. A l'inverse, pour le montage de bioimpression sans couche absorbante, chaque impression était réalisée manuellement.

Tableau 2-9 : Nombre de répétitions des expériences de bioimpression réalisées avec couche absorbante.

Bioencres	Composition	Répétitions des expériences
A	Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM)	30
B	90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 15mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA)	30
C	1% (w/v) sodium alginate + 90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 15mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA)	30
D	Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) + cellules kératinocytes de lignée HaCaT (100 millions/ml)	30

Tableau 2-10 : Nombre de répétitions des expériences de bioimpression réalisées sans couche absorbante.

Bioencres	Composition	Répétitions des expériences
A	Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM)	5
B	90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 15mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA)	5
E	1% (w/v) sodium alginate + 90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 2mg/ml de dodécylsulfate de sodium (SDS)	5



## 2.5. Caractérisation des bioencres

---

### 2.5.1. Viscosité

#### 2.5.1.1. Bioencres modèle

Les viscosités dynamiques des bioencres A, B, C et E ont été évaluées à 20°C en utilisant un rhéomètre à contraintes imposées (AR 2000, TA Instruments, USA au Centre de Recherche Paul Pascal, France). Pour la valeur de la viscosité, nous avons utilisé sa valeur Newtonienne. Elle correspond à la viscosité d'un fluide newtonien qui est constant lorsqu'on varie les contraintes de cisaillement et le taux de contraintes pendant la mesure. Les viscosités des bioencres avaient un comportement newtonien à haut de taux de cisaillement ( $\sim 20 \text{ s}^{-1}$ ).

#### 2.5.1.2. Bioencre chargée en cellules

La viscosité de la bioencre D n'a pas été mesurée (Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) + cellules kératinocytes de lignée HaCaT (100 millions/ml)) car les mesures de rhéomètre à contrainte imposées étaient réalisées sous une géométrie particulière (cône plan) qui impose que la taille des objets en suspension soit d'au maximum 5  $\mu\text{m}$ . Or, la taille moyenne des cellules kératinocytes étant d'environ 150  $\mu\text{m}$ , la mesure de la bioencre cellulaire serait invalidée.

### 2.5.2. Tension de surface et densité

Pour mesurer la tension de surface, la densité a été quantifiée avec un densimètre à tube en U oscillant (DMA 4500 M, Anton Paar, Allemagne) avec une précision de mesure de  $0.00005 \text{ g/cm}^3$ . Puis, un tensiomètre à goutte pendante (TRACKER M, TECLIS Instruments, France) avec un logiciel dédié a été employé pour mesurer la tension de surface pour les bioencres A, B, C et E du procédé sans couche absorbante.

### 2.5.3. Spectres d'absorption

Les spectres d'absorbance pour les bioencres A, B, C et E de la bioimpression sans couche absorbante ont été mesurés en unité arbitraires avec un spectrophotomètre (UV-3600 Plus, Simadzu, Japon). La résolution est de 0,1 nm et de 0,00003 « absorbance » (unités arbitraires) en niveau de bruit à 1500 nm.

### 2.5.4. En résumé

Les caractéristiques des bioencres utilisées pour les deux montages de bioimpression (AC: avec couche absorbante et SC: sans couche absorbante) sont résumées ci-dessous:

Tableau 2-11 : Composition des bioencres pour les deux procédés de bioimpression.

Process	Bioencre	Composition
AC/SC	A	Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM)
AC/SC	B	90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 15mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA)
AC	C	1% (w/v) sodium alginate + 90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 15mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA)
AC	D	Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) + cellules kératinocytes de lignée HaCaT (100 millions/ml)
SC	E	1% (w/v) sodium alginate + 90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 2mg/ml de dodécylsulfate de sodium (SDS)

1. R. P. Sinha and D.-P. Häder, "UV-induced DNA damage and repair: a review," *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 225–236 (2002).
2. F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, J. Lopez, M. Faucon, B. Pippenger, R. Bareille, M. Rémy, S. Bellance, P. Chabassier, J. C. Fricain, and J. Amédée, "High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering," *Acta Biomater.* **6**, 2494–2500 (2010).
3. A. Souquet, *Etude Des Processus Physiques Mis En Jeu Lors de La Microimpression D'éléments Biologiques Assistée Par Laser* (Bordeaux 1, 2011).
4. A. Muhammad, E. Pages, A. Ducom, A. Fontaine, and F. Guillemot, "Controlling laser-induced jet formation for bioprinting mesenchymal stem cells with high viability and high resolution," *Biofabrication* **6**, 045001 (2014).
5. L. D. Landau, J. S. Bell, M. J. Kearsley, L. P. Pitaevskii, E. M. Lifshitz, and J. B. Sykes, *Electrodynamics of Continuous Media* (elsevier, 1984), Vol. 8.
6. J. R. Blake and D. C. Gibson, "Cavitation Bubbles Near Boundaries," *Annu. Rev. Fluid Mech.* **19**, 99–123 (1987).
7. A. Patrascioiu, J. M. Fernández-Pradas, A. Palla-Papavlu, J. L. Morenza, and P. Serra, "Laser-generated liquid microjets: correlation between bubble dynamics and liquid ejection," *Microfluid. Nanofluidics* (2013).
8. M. Ali, E. Pages, A. Ducom, A. Fontaine, and F. Guillemot, "Controlling laser-induced jet formation for bioprinting mesenchymal stem cells with high viability and high resolution," *Biofabrication* **6**, 045001 (2014).

### 3. Bioimpression par laser femtoseconde avec couche absorbante

*Ce troisième chapitre présente les résultats expérimentaux de bioimpression par laser femtoseconde avec une couche absorbante d'or. Tout d'abord, les valeurs des caractéristiques des bioencres sont résumées (spectres d'absorbance, viscosités et tensions de surface). Puis, le mécanisme d'éjection de la bioimpression est étudié par analyse post-mortem des impressions de bioencres visqueuses et d'une bioencre cellulaire. L'influence de l'énergie est observée sur les diamètres imprimés et la viabilité cellulaire. Ensuite, la morphologie de l'éjection de la bioimpression pour les bioencres visqueuse est étudiée par imagerie résolue en temps. Les paramètres d'énergie, de temps de l'éjection et de position de focalisation sont analysés. Enfin, une analyse transverse de l'étude post-mortem et de l'étude d'imagerie résolue en temps est réalisée.*

<b>3. Bioimpression par laser femtoseconde avec couche absorbante.....</b>	<b>87</b>
<b>3.1. Caractérisation des bioencres .....</b>	<b>89</b>
3.1.1. Spectres d'absorption .....	89
3.1.2. Caractéristiques rhéologiques des bioencres .....	90
<b>3.2. Etude Expérimentale du Mécanisme d'Ejection par analyse Post-Mortem .....</b>	<b>92</b>
3.2.1. Influence de l'Energie sur les diamètres imprimés .....	92
3.2.2. Influence de l'Energie sur la viabilité cellulaire.....	94
<b>3.3. Etude Expérimentale du Mécanisme d'Ejection par Imagerie Résolue en Temps....</b>	<b>97</b>
3.3.1. Influence de l'Energie.....	97
3.3.2. Influence temporelle.....	100
3.3.3. Influence de la position de focalisation.....	103
<b>3.4. Conclusion.....</b>	<b>108</b>
3.4.1. Discussion générale.....	108
3.4.2. En résumé.....	109

## 3.1. Caractérisation des bioencres

---

### 3.1.1. Spectres d'absorption

Nous avons cherché à déterminer si les bioencres absorbaient de la même façon la longueur d'onde laser (1030 nm) en mesurant les spectres d'absorbance des bioencres. En effet, la mesure de spectres identiques à la longueur d'onde laser indiquerait que l'on ne pourrait imputer à l'absorbance des différences de résultats entre les bioencres. Nous avons mesuré l'absorbance sur un large spectre de longueurs d'ondes (300 nm à 1200 nm) de façon à caractériser les bioencres pour une future utilisation des bioencres avec d'autres longueurs d'onde laser dans notre équipe de recherche.

Ainsi, les spectres d'absorbance pour les bioencres A, B et C de la bioimpression avec couche absorbante ont été mesurés et sont présentés ci-dessous.

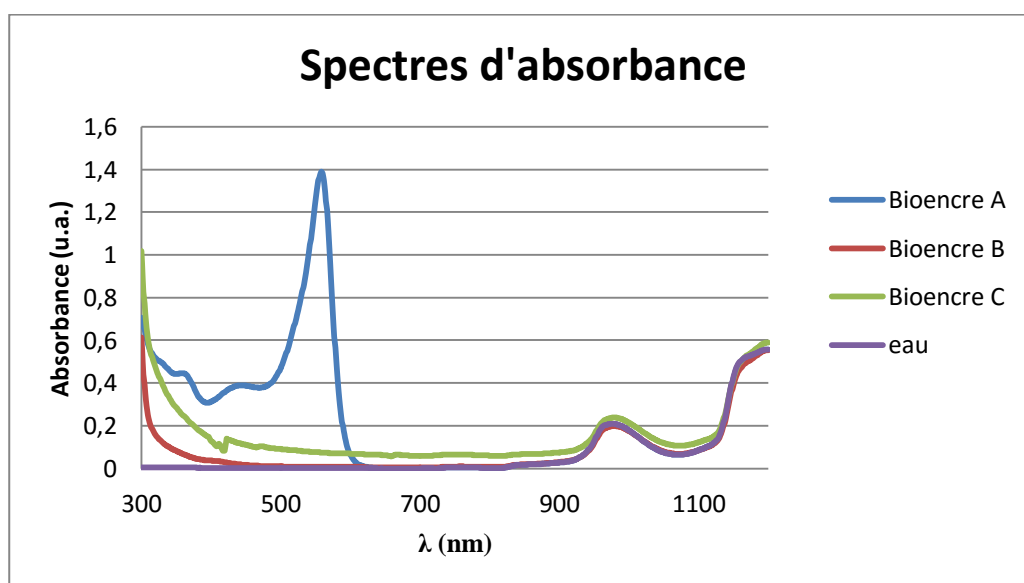


Figure 36 : Spectres d'absorbance pour les bioencres de la bioimpression avec couche absorbante.

Différents pics d'absorbance sont visibles sur les spectres :

- pour la bioencre A, à 555 nm
- pour la bioencre B, à 970 nm et l'absorbance augmente vers 300 nm et vers 1200 nm

- pour la bioencre C, à 970 nm et l'absorbance augmente vers 300 nm et vers 1200 nm
- pour l'eau, à 970 nm et l'absorbance augmente vers 1200 nm

Ainsi, on remarque que les spectres d'absorbance des bioencres B et C sont très similaires au spectre de l'eau sur la gamme de longueurs d'onde observées (300 nm à 1200 nm).

A partir de ces spectres, nous nous sommes intéressés à la valeur d'absorbance à la longueur d'onde laser employée de 1030 nm :

Tableau 3-1 : Absorbance (unités arbitraires, pour 1 cm d'épaisseur traversée) des bioencres à 1030 nm, la longueur d'onde laser.

Bioencre ou solution	Absorbance (unité arbitraires) à 1030 nm
Bioencre A	0,107
Bioencre B	0,11
Bioencre C	0,149
eau	0,107

Les différents spectres ne présentent pas de pic d'absorbance à la longueur d'onde laser utilisée (1030 nm). Ainsi, l'absorbance des solutions ne peut expliquer l'interaction laser-matière à l'origine de procédé de bioimpression par laser.

### 3.1.2. Caractéristiques rhéologiques des bioencres

Les caractéristiques rhéologiques des bioencres ont été étudiées car elles définissent le comportement de ces liquides sous l'action de contraintes. Dans le cas de la bioimpression, la contrainte est provoquée par la bulle de cavitation induite par l'impulsion laser. Parmi les nombreux paramètres rhéologiques, la littérature de la bioimpression a identifié la viscosité et la tension de surface comme paramètres

importants, pouvant expliquer le comportement du jet de l'impression [1]. La formation du jet a été reliée à la dynamique de la bulle de cavitation [2,3]. Aussi, la croissance de la bulle de cavitation, à l'origine du jet de l'impression, dépend principalement de la viscosité et de la tension de surface du liquide [4,5].

Ainsi, les caractéristiques rhéologiques des bioencres utilisées pour la bioimpression avec couche absorbante sont résumées ci-dessous:

Tableau 3-2 : Composition et propriétés physiques (à 20°C) des bioencres pour la bioimpression avec couche absorbante.

Bioencre	Composition	Viscosité (mPa. s)	Tension de Surface (mN/m)	Densité
A	Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM)	1,28	73,5 ± 0,8	1,0084
B	90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 15mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA)	1,5	55,6 ± 0,6	1,0247
C	1% (w/v) sodium alginate + 90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 15mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA)	146	55,6 ± 0,5	1,0327
D	Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) + cellules kératinocytes de lignée HaCaT (100 millions/ml)			

Les bioencres A et B présentent des viscosités similaires tandis que la bioencre C est environ 104 fois plus visqueuse. Les tensions de surfaces sont identiques pour les bioencres B et C tandis que la bioencre A a une tension de surface 0,75 fois plus grande.



## 3.2. Etude Expérimentale du Mécanisme d'Ejection par analyse Post-Mortem

---

Nous nous sommes attachés ici à caractériser les gouttes de bioencres après impression, aussi appelé analyse post-mortem, pour des bioencres visqueuses et cellulaires en variant l'énergie laser.

### 3.2.1. Influence de l'Energie sur les diamètres imprimés

#### Description

Des expériences de bioimpression ont été réalisées pour les différentes bioencres et les résultats sont présentés Figure 37. L'énergie variait de 1,5  $\mu\text{J}$  à 3,5  $\mu\text{J}$ , en augmentant par pas de 0,25  $\mu\text{J}$  ou 0,5  $\mu\text{J}$  et le diamètre de gouttes imprimées a été mesuré. La plus haute énergie de 3,5  $\mu\text{J}$  correspondait à l'énergie maximale atteignable par notre montage expérimental.

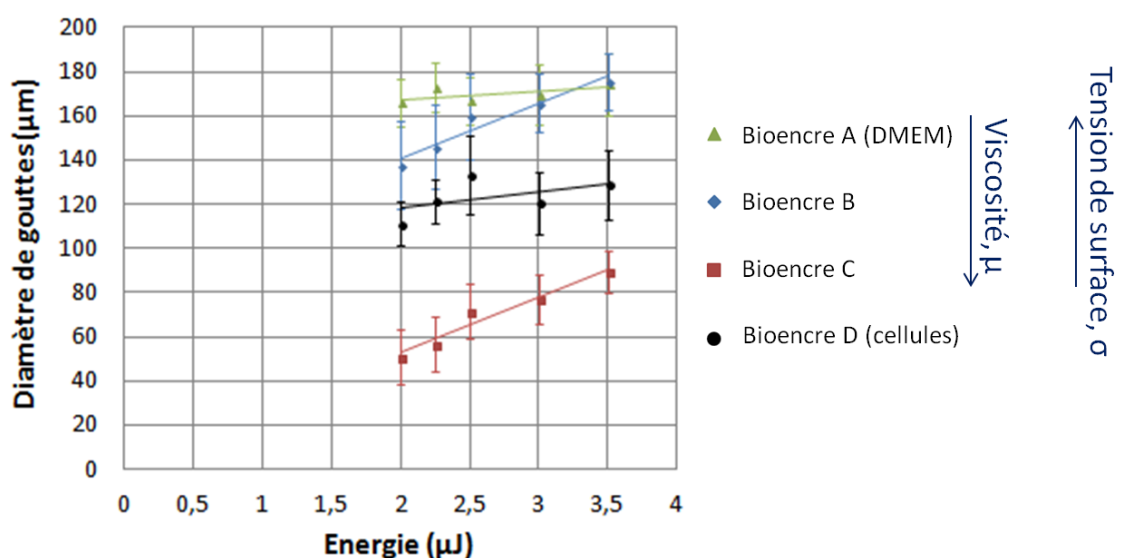


Figure 37 : Diamètre de goutte imprimé en fonction de l'énergie laser.

## Résultats expérimentaux

On remarque sur la Figure 37 que les différentes bioencres (A, B, C et D) ont été imprimées pour une énergie supérieure ou égale à 2  $\mu\text{J}$ . Aussi, on remarque que l'augmentation de l'énergie laser résultait en l'augmentation des diamètres de gouttes pour chaque bioencre. Cette augmentation était linéaire pour toutes les bioencres.

Dans le cas des bioencres A et B, l'évolution du diamètre des gouttes était très similaire:

- pour la bioencre A, le diamètre augmentait de 150  $\mu\text{m}$  à 2  $\mu\text{J}$  jusqu'à environ 175  $\mu\text{m}$  à 3,5  $\mu\text{J}$
- pour la bioencre B, le diamètre variait de 134  $\mu\text{m}$  à 2  $\mu\text{J}$  jusqu'à environ 175  $\mu\text{m}$  à 3,5  $\mu\text{J}$

L'impression de la bioencre D (contenant des cellules kératinocytes) résultait en des diamètres de gouttes intermédiaires: de 90  $\mu\text{m}$  à 2  $\mu\text{J}$  jusqu'à 110  $\mu\text{m}$  à 3,5  $\mu\text{J}$ . La bioencre C a été imprimée avec le diamètre de gouttes le plus faible: de la plus faible à la plus haute énergie (2 à 3,5  $\mu\text{J}$ ), il augmentait de 50 à 88  $\mu\text{m}$ .

## Discussion

Le diamètre des gouttes imprimées augmentait en augmentant l'énergie laser. Ceci confirme des études précédentes [6,7] où une impulsion nanoseconde a été utilisée avec des bioencres visqueuses avec et sans cellules. De plus, Patrascioiu et al. [8] ont réalisé des observations similaires en utilisant une impulsion laser femtoseconde et une bioencre visqueuse.

En outre, la quasi-linéarité de ces courbes de diamètres imprimés de 2 à 4  $\mu\text{J}$  a été observée pour une solution visqueuse contenant de l'eau et 50 % (v/v) de glycérol ainsi qu'un agent tensio-actif (dodécylsulfate de sodium concentré à 2 mg/ml [9]).

Le diamètre des gouttes imprimées ne semble pas dépendre de la tension de surface : à une même tension de surface de 55,6 mN/m les bioencres B et C sont imprimées avec des diamètres variants fortement (à 2  $\mu\text{J}$  le diamètre est de 140  $\mu\text{m}$  pour la bioencre B et de 50  $\mu\text{m}$  pour la bioencre C ; à 3,5  $\mu\text{J}$  le diamètre est de 175  $\mu\text{m}$  pour la bioencre B et de 190  $\mu\text{m}$  pour la bioencre C).

Au contraire, le diamètre des gouttes varie avec la viscosité (1,5 mPa.s pour la bioencres B et 146 mPa.s pour la bioencres C). Nous avons observé que plus la viscosité est faible et plus le diamètre imprimé est grand, à distance donneur-receveur et fluence constantes, dans le cas d'un régime d'impression (*cf.* Figure 37). Ceci confirme des études antérieures [6,10].

En outre, les diamètres similaires sur la Figure 37 en fonction de l'énergie sur la Figure 39 pour les bioencres A et B sont explicables par leurs viscosités proches (1,28 mPa.s pour la bioencres A et 1,5 pour la bioencres B).

### 3.2.2. Influence de l'Energie sur la viabilité cellulaire

#### **Description**

Des expériences de viabilité cellulaire par le test Live/Dead ont été réalisées après bioimpression de la bioencres cellulaire D (Figure 38). L'énergie a été variée de 2,5 à 3,5  $\mu\text{J}$ , en augmentant par pas de 0,5  $\mu\text{J}$ . Les tests de viabilité cellulaire Live/Dead ont été réalisés un jour après l'impression.

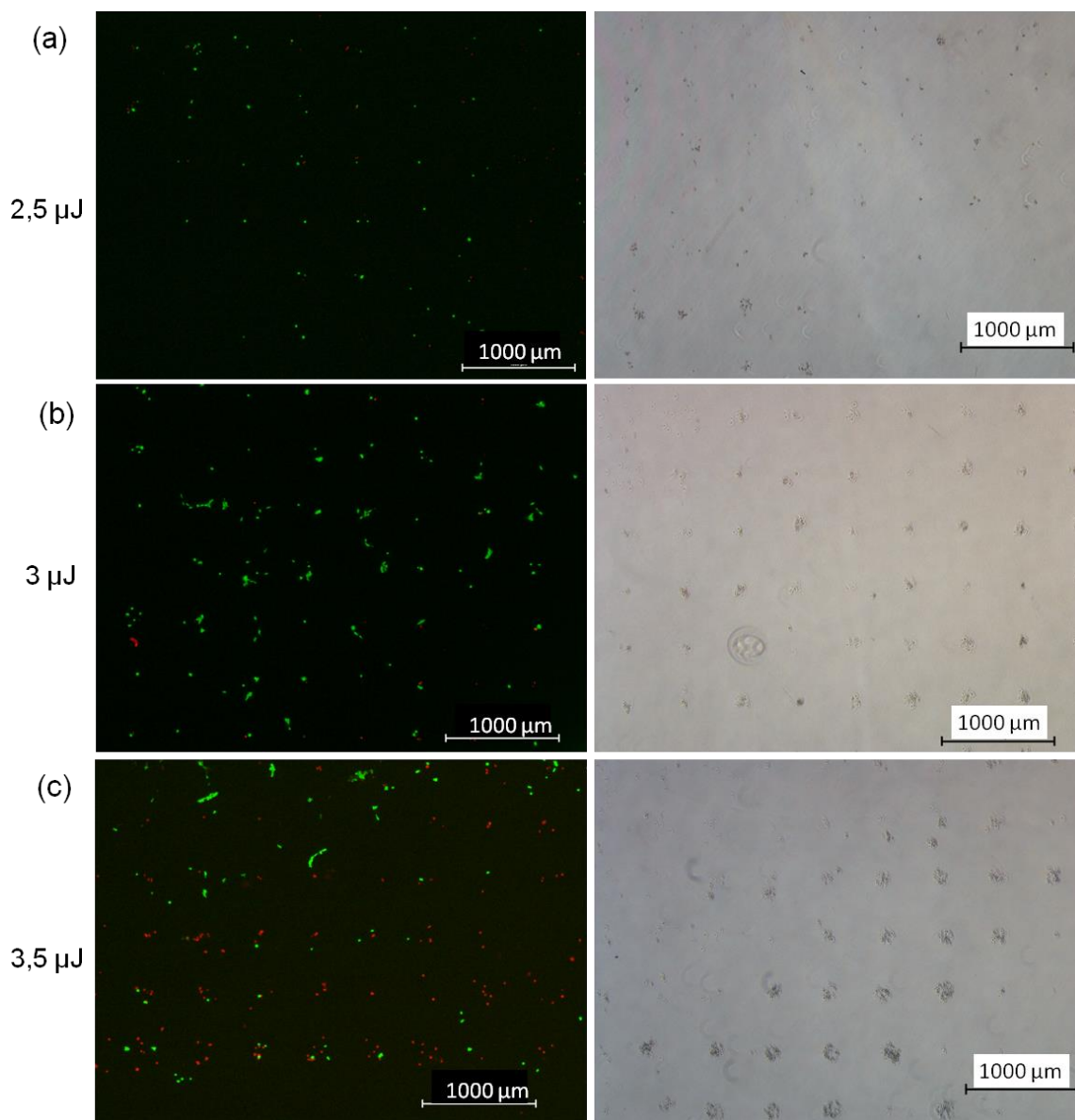


Figure 38 : Test de viabilité Live/Dead, 24 h après l'impression de la bioencre cellulaire D à 2,5  $\mu$ J ; 3  $\mu$ J ; 3,5  $\mu$ J. Sur la colonne de gauche : images en fluorescence avec les cellules vivantes représentées en vert sur les photos et les cellules mortes représentées en rouge. Sur la colonne de droite : images en lumière blanche.

## Résultats expérimentaux

On remarque sur la Figure 38 que les cellules de la bioencre ont été imprimées de manière plus importante à 3,5  $\mu$ J et à 3  $\mu$ J qu'à 2,5  $\mu$ J. Le nombre de cellules imprimées est comparable pour les énergies de 3 et de 3,5  $\mu$ J.

Nous avons constaté que presque toutes les cellules étaient vivantes après avoir été imprimées (cellules fluorescentes vertes) à 3  $\mu$ J alors qu'une quantité importante de cellules mortes étaient présente à 3,5  $\mu$ J (cellules fluorescentes rouges).

## Discussion

Nous avons observé que la meilleure énergie pour imprimer la bioencres C de cellules était une énergie intermédiaire de 3  $\mu\text{J}$ , inférieure à l'énergie maximale (3,5  $\mu\text{J}$ ). En effet, c'est à cette énergie de 3  $\mu\text{J}$  qu'il y a le moins de cellules mortes et que le nombre de cellules imprimées est le plus important (Figure 38).

La littérature confirme cette observation. En effet, Lin et al. [11] ont montré qu'un paramètre proportionnel à l'énergie, la fluence (i.e. énergie surfacique), peut réduire la viabilité de cellules de cancer du côlon humain, si sa valeur est élevée. Dans notre étude, l'augmentation de l'énergie résulte en l'augmentation de la fluence car l'optique de focalisation du laser n'a pas été modifiée. Aussi, Catros et al. [12], ont montré une diminution de la viabilité cellulaire en augmentant l'énergie pour des cellules endothéliales.

De plus, les énergies nécessaires, avec un procédé similaire en utilisant un laser de 30 nanosecondes sont d'environ 11  $\mu\text{J}$  pour produire un jet, et de 21  $\mu\text{J}$  pour imprimer des cellules souches mésenchymateuses [13] au lieu de 2  $\mu\text{J}$  à 3,5  $\mu\text{J}$  pour produire un jet et d'impression kératinocytes cellules avec un laser femtoseconde dans cette étude. En effet, les énergies requises pour imprimées sont plus faibles avec un laser femtoseconde, du fait de la plus forte intensité laser ( $10^{12}$  à  $10^{14}$   $\text{Watt}/\text{cm}^2$  en focalisé), due à la brièveté de l'impulsion, qu'avec un laser nanoseconde (jusqu'à  $10^{12}$   $\text{W}/\text{cm}^2$  en focalisé). Les phénomènes non linéaires dus à la forte intensité laser (§ Chapitre 1 : Introduction) expliquent finalement l'énergie moindre requise pour imprimer avec des lasers femtosecondes. Par ailleurs, d'après les études citées précédemment [11,12] et indiquant qu'une trop forte énergie entraîne une baisse de la viabilité cellulaire, la faible énergie requise pour imprimer avec un laser femtoseconde permettrait de mieux conserver la viabilité cellulaire, comparé à la forte énergie nécessaire à la bioimpression par laser nanoseconde.

En outre, la zone affectée par la chaleur lors de l'ablation de l'or est réduite en utilisant des impulsions femtosecondes par rapport aux impulsions nanosecondes: comme le temps caractéristique de diffusion des électrons est de l'ordre de 10 ps pour des impulsions inférieures à 10 ps, la diffusion de l'énergie de la chaleur peut être négligée devant la durée de l'impulsion laser femtoseconde. La couche d'or est ablatée avant que la diffusion de la chaleur n'ait pu se produire (§ Chapitre 1 : Introduction).

### 3.3. Etude Expérimentale du Mécanisme d'Ejection par Imagerie Résolue en Temps

---

#### 3.3.1. Influence de l'Energie

##### **Description**

Des expériences de génération de jets par une impulsion laser ont été réalisées et observées par imagerie résolue en temps. Les résultats sont présentés sur la Figure 39. Chaque photo a été prise 90  $\mu$ s après l'impulsion laser pour les bioencres sans cellules (A, B et C), en utilisant des énergies laser croissantes. Les énergies appliquées étaient les mêmes que celles présentées en Figure 37 (1,5  $\mu$ J à 3,5  $\mu$ J). La hauteur de l'image représente 1100  $\mu$ m, ce qui est similaire à la distance d'impression que nous avons utilisé pour les expériences de la Figure 37 (1000  $\mu$ m).

De plus, la hauteur des jets a été mesurée sur les images obtenues par TRI de la Figure 39. Elle est représentée Figure 40. Lors de la mesure de la hauteur, seule la partie continue du jet a été mesurée car avec celle-ci l'impression est plus précise, elle ne génère pas de gouttes « satellites » imprimées à côté d'une goutte principale [2,13].

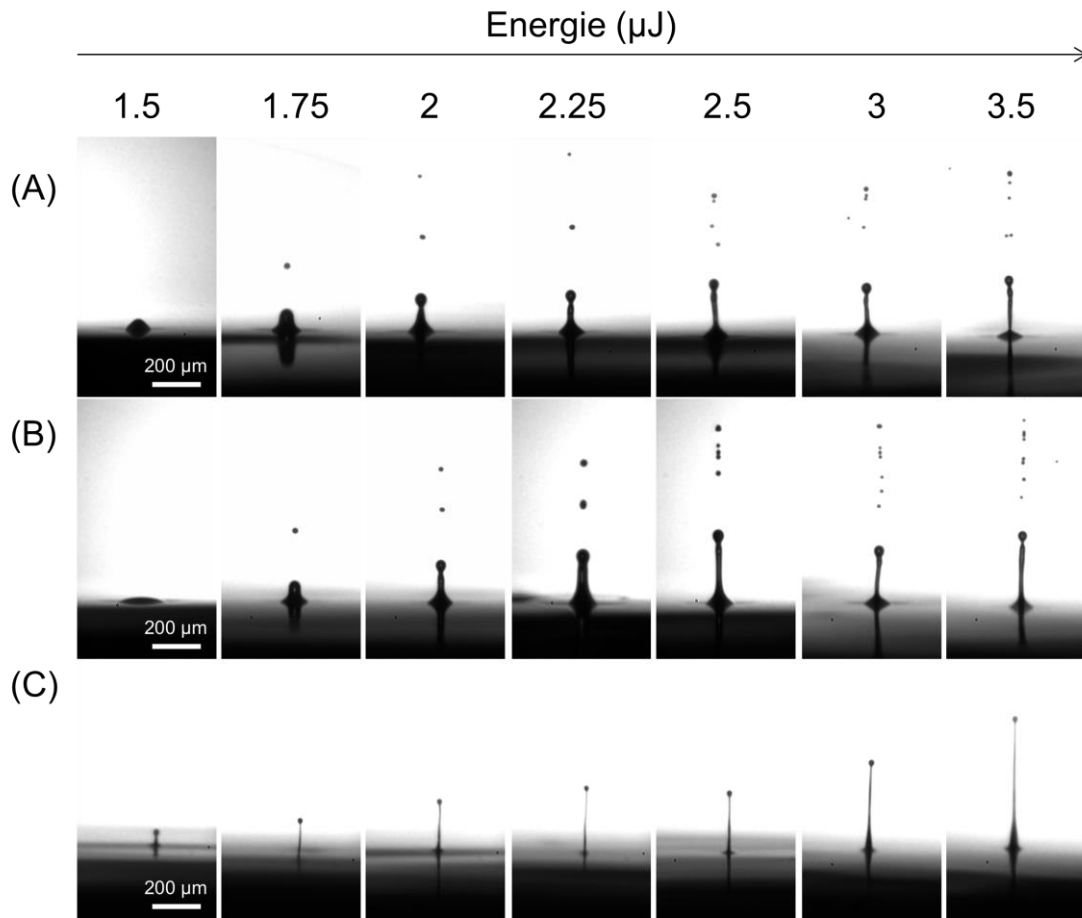


Figure 39 : Imagerie résolue en temps de l'hydrodynamique du jet induit par laser, observé 90  $\mu\text{s}$  après l'impulsion laser, comme une fonction de l'énergie laser. Les résultats sont présentés pour les bioencres sans cellules : A, B et C.

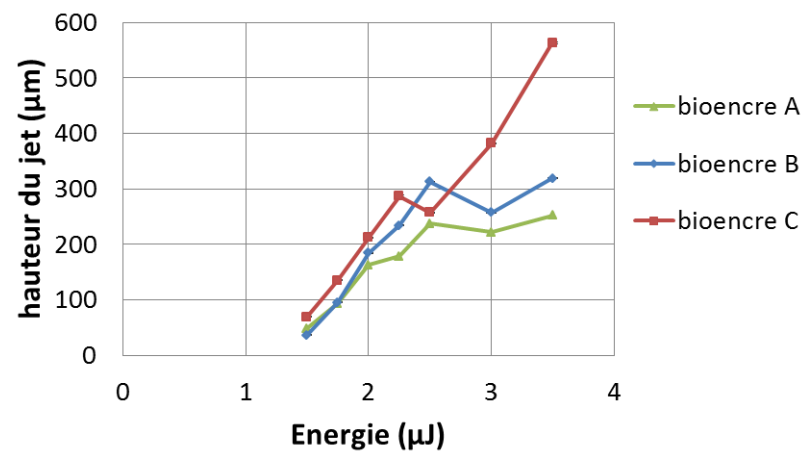


Figure 40 : Hauteur des jets en fonction de l'Energie, 90  $\mu\text{s}$  après l'impulsion laser, pour les bioencres A, B et C.

## Résultats expérimentaux

De 1,75  $\mu\text{J}$  à 3,5  $\mu\text{J}$ , un jet se formait pour toutes les bioencres et la hauteur de ce jet tendait à croître avec l'augmentation de l'énergie. Ceci est particulièrement visible pour la bioencre C.

De plus, il y avait deux comportements similaires pour les bioencres A et B: le jet se rompait en une ou plusieurs gouttes en fonction de l'énergie laser. Le nombre de gouttes augmentait en parallèle avec l'énergie laser (voir (A) et (B) sur la Figure 39). Contrairement aux jets des bioencres A et B, le jet de la bioencre C ne se rompait pas pour les énergies étudiées.

En outre, la hauteur du jet était stable pour les bioencres A et B de 2,5  $\mu\text{J}$  à 3,5  $\mu\text{J}$ , alors que la hauteur du jet augmentait significativement pour la bioencre C de 2,5  $\mu\text{J}$  à 3,5  $\mu\text{J}$ .

## Discussion

La viscosité des bioencres peut expliquer certains de nos résultats. En effet, les évolutions de jet similaires en fonction de l'énergie sur la Figure 39 pour les bioencres A et B sont explicables par leurs viscosités proches (1,28 mPa.s pour la bioencre A et 1,5 mPa.s pour la bioencre B). Par ailleurs, la viscosité élevée de 146 mPa.s pour la bioencre C explique que les jets soient sous forme de fils longs et minces [14] comparés aux jets des autres bioencres (*cf.* Figure 39).

De plus, on peut expliquer la rupture du jet en gouttes par l'instabilité hydrodynamique de Rayleigh-Plateau [15]. Elle est normalement dirigée par la tension de surface du liquide, qui vise à réduire l'énergie de surface d'un système. La rupture du jet en gouttes est entraînée par les instabilités du jet, aussi longtemps que ces instabilités augmentent le long du jet. Cet état du jet rompu est un état où l'énergie de surface est bien inférieure à celle du jet avant rupture [16].

Cependant, nous observons le même comportement de rupture du jet en gouttes pour les bioencres A et B possédant des tensions de surfaces différentes, respectivement de 73,5 mN/m et de 55,6 mN/m, mais des viscosités similaires, respectivement de 1,28 mPa.s et de 1,5 mPa.s (*cf.* Tableau 3-2 et Tableau 3-3). ). Donc, on peut supposer que la tension de surface ne différait pas suffisamment entre les bioencres A et B pour qu'une différence sur la rupture du jet puisse être observée.



Tableau 3-3 : Schéma des viscosités et tensions de surface des bioencres sans cellules pour la bioimpression avec couche absorbante. Les notations de viscosités  $\mu$  et tensions de surfaces  $\sigma$  sont identiques pour plusieurs bioencres lorsque les valeurs de ces paramètres sont proches ou égales.

Bioencre	Viscosité	Tension de surface
A	$\mu_A$	$\sigma_A$
B	$\mu_B$	$\sigma_A$
C	$\mu_B$	$\sigma_C$

$\downarrow$  Viscosité,  $\mu$

$\uparrow$  Tension de surface,  $\sigma$

De plus, nous notons une rupture du jet pour la bioencre B qui n'a pas lieu pour la bioencre C. Or, les bioencres B et C ont les mêmes tensions de surface de 55,6 mN/m, mais des viscosités différentes, respectivement de 1,5 mPa.s et de 146 mPa.s. Ainsi, nous pouvons supposer que lorsque la viscosité varie de manière importante, elle dirige le phénomène de rupture du jet, à la place de la tension de surface.

### 3.3.2. Influence temporelle

#### Description

Des expériences de génération de jets par une impulsion laser ont été réalisées pour les bioencres sans cellules (A, B et C) et observées par imagerie résolue en temps. L'évolution temporelle du jet a été suivie toutes les 20  $\mu$ s, de 10  $\mu$ s à 70  $\mu$ s après l'impulsion laser, pour l'énergie minimale de 1,5  $\mu$ J et l'énergie maximale de 3,5  $\mu$ J utilisées précédemment (Figure 37 et Figure 39). Les résultats sont présentés sur la Figure 41. La hauteur de l'image représente environ 750  $\mu$ m.

De plus, la hauteur des jets a été mesurée d'après les images obtenues par TRI de la Figure 41 (*cf.* Figure 42).

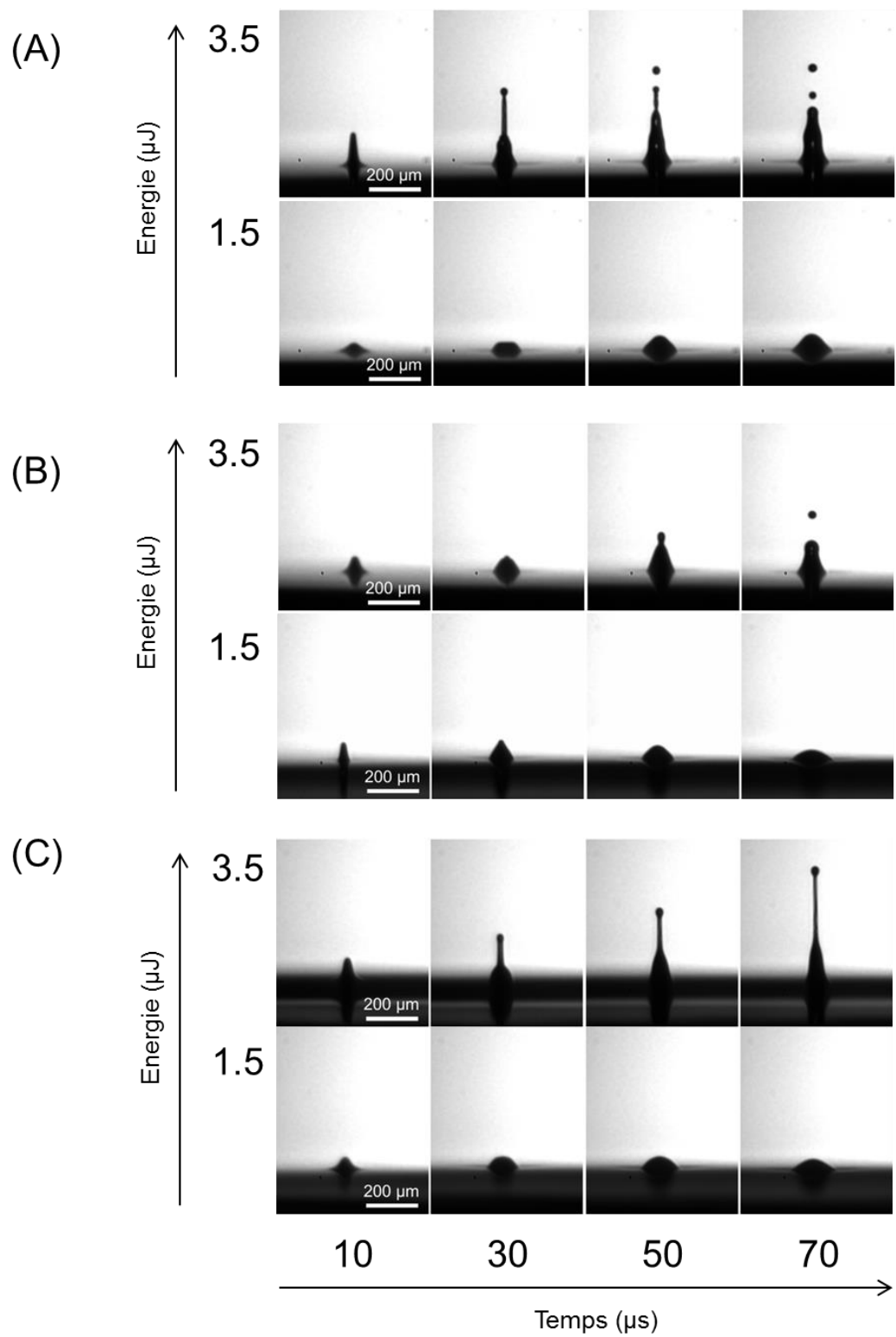
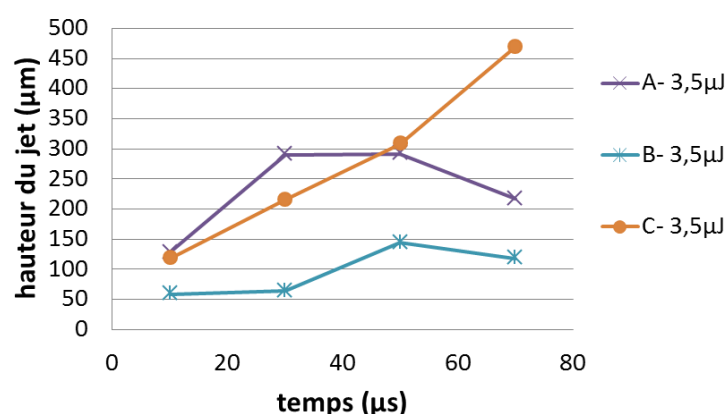


Figure 41 : Imagerie résolue en temps de l'hydrodynamique du jet induit par laser, observée à différents instants après l'impulsion laser (10, 30, 50 and 70  $\mu\text{s}$ ), pour les énergies laser extrêmes de l'expérience précédente : 1,5  $\mu\text{J}$  et 3,5  $\mu\text{J}$ . Les résultats sont présentés pour les bioencres sans cellules : A, B et C.

3,5  $\mu\text{J}$



1,5  $\mu\text{J}$

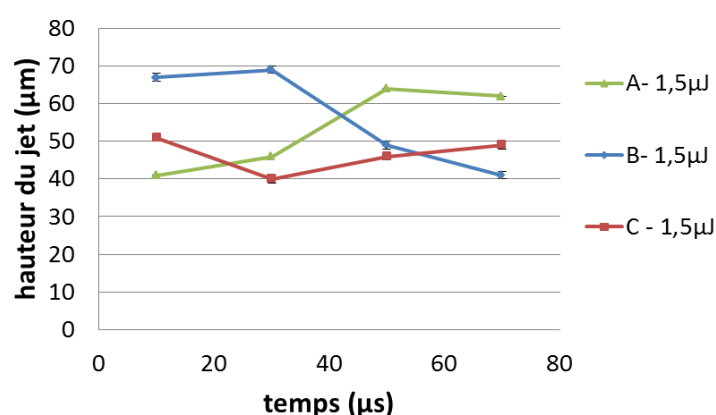


Figure 42 : Hauteur des jets en fonction du temps pour les bioencres A, B et C, à 2 énergies laser : 1,5  $\mu\text{J}$  et 3,5  $\mu\text{J}$ .

## Résultats expérimentaux

A 1,5  $\mu\text{J}$ , aucun jet n'a été observé pour les trois bioencres A, B et C. L'angle au sommet (i.e. « l'angle sur la face avant de la bulle ou du jet » [13]) était minimal à 10  $\mu\text{s}$ , puis il augmentait de manière importante jusqu'à 30  $\mu\text{s}$ , puis l'augmentation de l'angle était plus réduite de 50  $\mu\text{s}$  à 70  $\mu\text{s}$ . L'évolution de l'angle au sommet peut être observée sur les images par la déformation forte et anguleuse de l'interface liquide/air à 10  $\mu\text{s}$ , puis par une déformation plus légère des surfaces des bioencres pour des temps d'observation plus élevés (la déformation devenait de plus en plus plate avec le temps).

A 3,5  $\mu\text{J}$ , un jet était formé pour les trois bioencres A, B et C à partir de 50  $\mu\text{s}$ . Le jet apparaissait 30  $\mu\text{s}$  après l'impulsion laser pour les bioencres A et C. D'abord, la déformation de la surface croissait, puis un jet apparaissait au cours de l'augmentation du temps. Dans le cas des bioencres A et B, le jet se rompait en gouttes à 50  $\mu\text{s}$  (bioencres A) ou à 70  $\mu\text{s}$  (bioencres B). Par la suite, la hauteur du jet diminuait (le jet collapsait) et libérait des gouttes de bioencres à partir de son sommet. Pour la bioencres C,

la plus visqueuse (146 mPa.s), le jet continuait de grandir jusqu'au dernier temps d'observation de 70  $\mu$ s. En outre, des structures en forme de couronne pouvaient être observées à la base des jets: 30  $\mu$ s après l'impulsion laser pour les bioencres A & C et 50  $\mu$ s après l'impulsion laser pour la bioencre B.

## Discussion

Des différences entre les évolutions temporelles des jets des bioencres A et B ont été observées. Le jet se rompait en gouttes à 30  $\mu$ s pour la bioencre A et à 50  $\mu$ s pour la bioencre B. En outre, la hauteur jet était plus importante pour la bioencre A que pour la bioencre B pour des temps d'observation similaires. Ces différences entre les bioencres A et B pourraient être dues à leur différence de composition, même si leurs viscosités sont proches. En effet, un agent tensio-actif (Albumine de sérum bovin, BSA) est présent pour la bioencre B qui abaisse la tension superficielle et assure ainsi la cohésion des molécules dans la bioencre. Ainsi le composé BSA pourrait expliquer que le jet se rompe plus tard pour la bioencre B.

Par ailleurs, la viscosité élevée de la bioencre C (146 mPa.s) explique que les jets soient sous forme de fils longs et minces [14] comparés aux jets des autres bioencres (*cf.* Figure 41).

### 3.3.3. Influence de la position de focalisation

## Description

Dans le procédé classique de bioimpression avec couche absorbante, la position de focalisation laser est placée à une position de référence (« focus reference » sur la Figure 43 et sur la Figure 44) correspondant à la couche d'or, afin de d'ablater cette couche le plus efficacement possible. Afin d'évaluer l'effet de la variation de la position de focalisation, selon la direction de propagation longitudinale du faisceau (direction z sur la Figure 43), le substrat donneur a été déplacé dans la direction z. Puis, le jet de liquide induit par laser a été observé grâce au montage du TRI et les résultats sont présentés sur la Figure 44.

De plus, la fluence (i.e. l'énergie surfacique) sur la couche d'or a été calculée sur la Figure 44, afin d'expliquer les résultats d'imagerie du jet.

Aussi, la hauteur du jet a été mesurée d'après les images obtenues par TRI de la Figure 44 (Figure 45).

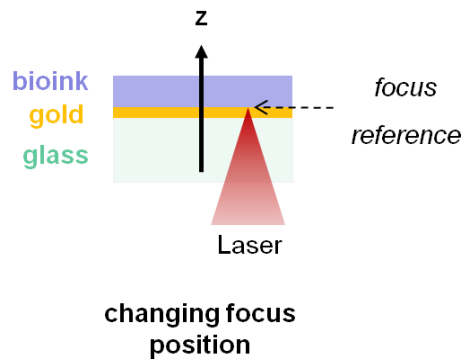


Figure 43 : Schéma de la variation de la position de focalisation laser pour la bioimpression avec couche absorbante.

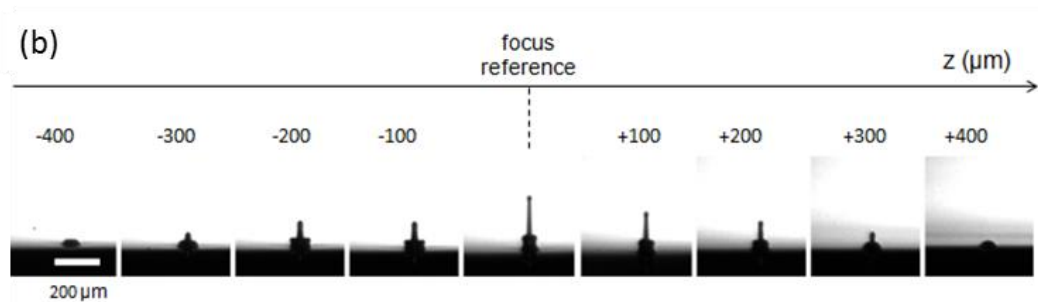
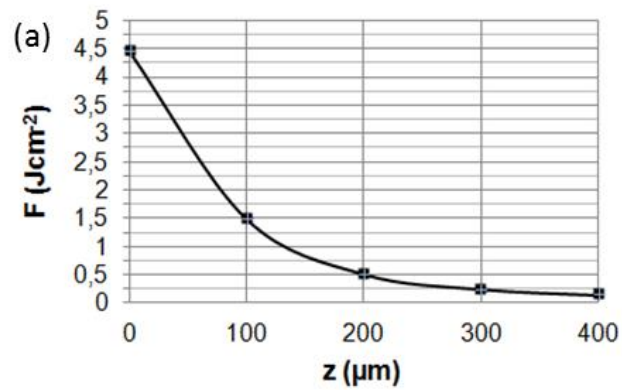


Figure 44 : (a) Fluence calculée sur la couche d'or quand la position de focalisation laser  $z$  varie. (b) Formation du jet par imagerie résolue en temps, observé 20  $\mu\text{s}$  après l'impulsion laser, en variant la position de focalisation laser, pour la bioencre A. L'énergie laser était de 3,5  $\mu\text{J}$  et correspondait à une fluence laser focalisée sur la position de référence de 4,5  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . La position de référence est désignée par « focus reference ».

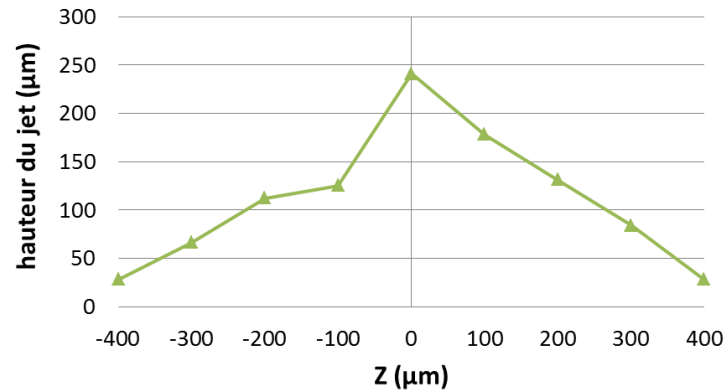


Figure 45 : Hauteur du jet en fonction de la position de focalisation pour la bioencre A, 20  $\mu\text{s}$  après l'impulsion laser.

## Résultats expérimentaux

### Calcul de la fluence sur la couche d'or lors de la variation de la position de focalisation

La fluence laser a été calculée sur la couche d'or, lors du déplacement de la position de focalisation à travers la bioencre et le donneur. Ce calcul a été effectué avec les étapes suivantes:

Tout d'abord, la dimension du disque d'Airy  $R_{\text{Airy}}$  (limite de Fraunhofer de la diffraction) peut être grossièrement approximée par  $w_0$ , la taille du faisceau laser ou le rayon laser à la position de focalisation.

Puis, les équations classiques du disque d'Airy  $R_{\text{Airy}}$  et de la zone de Rayleigh  $2.z_0$ , représentant la profondeur de focalisation de la lentille, ont été utilisées pour calculer  $w(z)$  dans l'équation (3.3.3.1), le rayon du faisceau laser à une « distance  $z$  » de la position de focalisation. En considérant le faisceau laser gaussien,  $w(z)$  a été calculé :

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \frac{z^2}{z_0^2}} \quad (3.3.3.1)$$

Enfin, nous avons calculé la fluence du laser à une « distance  $z$  » de la position de focalisation dans l'équation (3.3.3.2), en approximant le faisceau laser par un disque à la position de focalisation :

$$F = \frac{E}{\pi w(z)^2} \quad (3.3.3.2)$$

Avec

- $R_{\text{Airy}}$ , le rayon du disque d'Airy, la limite de diffraction de Fraunhofer (cm).
- $\lambda$ , la longueur d'onde laser ( $\mu\text{m}$ ).
- ON, l'ouverture numérique de la lentille scanner (ON=0,125 car le diamètre d'Airy dans l'air était de  $10 \mu\text{m}$  et la profondeur de champ dans l'air était de  $150 \mu\text{m}$ )
- $z_0$ , la moitié de la profondeur de champs de la lentille scanner qui focalise le faisceau laser (cm).
- $w(z)$ , le rayon du faisceau laser à une « distance  $z$  » de la position de focalisation (cm).
- $w_0$ , la taille du faisceau laser, à savoir le rayon laser à la position de focalisation (cm).
- $z$ , la distance, dans la direction de propagation laser, entre la position considérée et la position de focalisation laser (cm).
- $F$ , la fluence laser ( $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ ).
- $E$ , l'énergie de l'impulsion laser (J).

## Imagerie du jet

Tout d'abord, on remarque sur la Figure 44 que plus la distance de défocalisation augmente, plus la fluence sur la couche d'or décroît.

De plus, la hauteur maximale du jet a été observée pour la position de référence « focus reference » donnée en Figure 43 et en Figure 44. Cette hauteur diminuait lorsque la position de focalisation s'éloignait de la référence de focalisation vers le substrat de verre ou vers la surface libre de la bioencres. La diminution de la hauteur du jet était symétrique dans les deux sens de défocalisation. De plus, le jet n'était plus présent à  $300 \mu\text{m}$  de la référence de focalisation dans les deux sens de défocalisation: cette position correspondait à une fluence du laser de  $0,25 \text{ Jcm}^{-2}$  sur la couche d'or. Aussi, cette fluence de  $0,25 \text{ Jcm}^{-2}$  est bien inférieure à la fluence de la Figure 41 de  $1,9 \text{ Jcm}^{-2}$  où aucun jet n'est produit pour les 3 bioencres.

## Discussion

Nous pouvons tirer plusieurs conclusions de l'étude de la position de focalisation laser Figure 44. Premièrement, nous avons confirmé que la position de référence de focalisation, i.e. sur la couche d'or, créait le jet le plus élevé et était donc la position de transfert énergétique la plus efficace. En outre, la forte symétrie des images de jet (Figure 44 et Figure 45), de chaque côté de la référence de focalisation (« focus reference » sur la Figure 44), ne révélait pas la présence de phénomènes interférant avec la génération de jets. En conséquence, les images peuvent être expliquées et mises en corrélation avec la fluence laser calculée à la surface de la couche d'or.

Tout d'abord, on remarque sur la Figure 44 que pour une distance de défocalisation de plus de 200  $\mu\text{m}$ , il n'y a pas la formation d'un jet mais une légère déformation de la surface du liquide. De plus, pour des images à des distances de défocalisation de 0 à 200  $\mu\text{m}$ , la surface d'or est ablatée car le seuil d'ablation de 0,5  $\text{J.cm}^{-2}$  [17] est inférieur ou égal aux fluences de la Figure 44. Ainsi, pour une impulsion laser défocalisée d'une distance inférieure ou égale à 200  $\mu\text{m}$ , plus la distance de défocalisation augmente et moins il y a de fluence disponible pour produire un jet, une partie de la fluence étant consommée par l'ablation de la couche d'or. Ceci s'observait sur la hauteur du jet qui diminuait en augmentant la distance de défocalisation.



## 3.4. Conclusion

---

### 3.4.1. Discussion générale

#### Régimes d'impression

Des expériences de TRI ont été menées pour déterminer les différents régimes de LAB en fonction de l'énergie du laser et du type de bioencres (Figure 39 et Figure 41). Classiquement, trois régimes sont décrits dans le processus de LAB: le régime de sous-seuil, où aucun jet est produit, le régime de jet, où un jet mince est formé, et le régime de panache où la bulle de cavitation collapse à proximité de la surface libre de la bioencre et crée un panache de liquide constitué de multiples gouttes [1,13]. Sur la Figure 39 et la Figure 41, seulement deux régimes ont été identifiés: le régime de sous-seuil (à 1,5  $\mu\text{J}$  pour les bioencres A, B et C) et le régime de jet (de 1,75  $\mu\text{J}$  à 3,5  $\mu\text{J}$ ).

L'évolution temporelle représentée en Figure 41 confirme que l'énergie du régime de sous-seuil est 1,5  $\mu\text{J}$ : aucun jet n'est formé à 1,5  $\mu\text{J}$  de 10 à 70  $\mu\text{s}$  après l'impulsion laser. En outre, le régime de jet est identifié à 3,5  $\mu\text{J}$  sur la Figure 41. Aucun régime de panache n'a été observé dans les expériences de TRI en Figure 39 et Figure 41 car l'énergie maximale du montage expérimental de 3,5  $\mu\text{J}$  n'était pas suffisamment élevée pour produire ce régime. L'observation du régime de panache aurait permis de définir le seuil maximal du régime de jet pour nos bioencres. En effet, le régime de panache, instable par nature, n'est pas recherché comme régime de fonctionnement de bioimpression.

#### Variation de la position de focalisation et tolérance en z

Nous pouvons prédire la plage de tolérance de la position de focalisation du laser, par rapport à la direction z, grâce aux fluences calculées sur la surface d'or (Figure 44) et grâce aux expériences de bioimpression sur receveur (Figure 37).

En effet, pour une fluence sur la référence de focalisation de 4,5  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  (fluence maximale pour notre montage expérimental et fluence utilisée en position de référence

de focalisation sur la Figure 44), la tolérance maximale était de 60  $\mu\text{m}$  car elle permettait d'atteindre une fluence de 2,5  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  sur l'or (cf. fluences sur la Figure 44). Cette fluence correspondait à une énergie de 2  $\mu\text{J}$ , soit l'énergie minimale pour imprimer (car d'après la Figure 37 il n'y a pas d'impression pour une énergie inférieure à 2  $\mu\text{J}$ ).

Au final, la tolérance en  $z$  de 60  $\mu\text{m}$  pour imprimer est supérieure à la profondeur de champ de  $\pm 40 \mu\text{m}$  du système optique dans l'air mais sa valeur reste très réduite. De plus, les calculs de fluence lors de la variation de la position de focalisation sur la Figure 44, corrélés avec les résultats d'impression en fonction de l'énergie sur la Figure 37, permettent de prédire jusqu'à quelle position de défocalisation le système de LAB pourra imprimer. Ceci est très utile pour maîtriser et régler le procédé de LAB sur des montages expérimentaux spécifiques.

### 3.4.2. En résumé

Premièrement, nous avons caractérisé les bioencres pour la bioimpression avec une couche absorbante d'or : les spectres d'absorbances, les viscosités et les tensions de surface ont été mesurées. Nous notons que les spectres d'absorbances de toutes les bioencres ne présentent pas de pic d'intensité pour la longueur d'onde laser. L'absorbance de la bioencre ne peut donc être tenue comme principal facteur de transfert de l'énergie à la bioencre lors de la bioimpression. De plus, les viscosités et tensions de surfaces des bioencres A, B et C s'étendaient respectivement de 1,28 mPa.s à 146 mPa.s et de 55,6 mN/m à 73,5 mN/m.

Deuxièmement, le mécanisme d'éjection de la bioimpression a été étudié par analyse *post-mortem* des impressions de bioencres visqueuses et d'une bioencre cellulaire. L'influence de l'énergie a été observée sur les diamètres imprimés et la viabilité cellulaire. Les diamètres imprimés variaient, de 50  $\mu\text{m}$  à 175  $\mu\text{m}$ , avec la viscosité de la bioencre et l'énergie : plus la viscosité était faible et plus l'énergie était importante, plus le diamètre imprimé était grand. Aussi, une énergie optimale d'impression pour la bioencre cellulaire de 3  $\mu\text{J}$  a été identifiée, car elle assurait la meilleure viabilité cellulaire avec le plus grand nombre de gouttes imprimées.

Troisièmement, l'imagerie résolue en temps a permis d'étudier la morphologie de l'éjection de la bioimpression pour les bioencres visqueuses. Les paramètres d'énergie, de temps de l'éjection et de position de focalisation ont été analysés. En particulier, une faible viscosité expliquait la rupture du jet en gouttes au cours du temps ou de l'augmentation de l'énergie. La tension de surface ne semblait pas avoir d'effet

significatif sur la rupture du jet, comparé aux variations de viscosités de l'étude. La variation de la position de focalisation a révélé une symétrie des jets, que la position soit déplacée vers la surface de la bioencres ou vers le substrat donneur pour des positions à moins de 200  $\mu\text{m}$  de la position de référence. Pour une impulsion laser défocalisée de plus de 200  $\mu\text{m}$ , l'absence de formation d'un jet pouvait être expliquée par la fluence calculée Figure 44, qui était inférieure au seuil d'ablation.

Enfin, l'analyse transverse de l'étude *post-mortem* et de l'étude d'imagerie résolue en temps ont permis d'identifier plusieurs régimes d'impression lors des expérimentations (régime de sous-seuil pour une énergie inférieure à 2  $\mu\text{J}$  et régime d'impression pour une énergie de 2 à 3,5  $\mu\text{J}$ ) et de déterminer une tolérance de 60  $\mu\text{m}$  sur la position de focalisation pour rester dans la fenêtre de fonctionnement du procédé d'impression, selon nos conditions expérimentales.

1. D. Young, R. C. Y. Auyeung, A. Piqué, D. B. Chrisey, and D. D. Dlott, "Plume and jetting regimes in a laser based forward transfer process as observed by time-resolved optical microscopy," *Appl. Surf. Sci.* **197-198**, 181–187 (2002).
2. A. Souquet, *Etude Des Processus Physiques Mis En Jeu Lors de La Microimpression D'éléments Biologiques Assistée Par Laser* (Bordeaux 1, 2011).
3. C. Mézel, A. Souquet, J. Breil, D. Hébert, and F. Guillemot, "Self-consistent modeling of jet formation process in the nanosecond laser pulse regime," *Phys. Plasmas* **16**, 123112 (2009).
4. F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, J. Lopez, M. Faucon, B. Pippenger, R. Bareille, M. Rémy, S. Bellance, P. Chabassier, J. C. Fricain, and J. Amédée, "High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering," *Acta Biomater.* **6**, 2494–2500 (2010).
5. A. Pearson, E. Cox, J. R. Blake, and S. R. Otto, "Bubble interactions near a free surface," *Eng. Anal. Bound. Elem.* **28**, 295–313 (2004).
6. B. Guillotin, A. Souquet, S. Catros, M. Duocastella, B. Pippenger, S. Bellance, R. Bareille, M. Rémy, L. Bordenave, J. Amédée, and F. Guillemot, "Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization," *Biomaterials* **31**, 7250–7256 (2010).
7. Y. Lin, Y. Huang, and D. B. Chrisey, "Metallic Foil-Assisted Laser Cell Printing," *J. Biomech. Eng.* **133**, 025001 (2011).
8. A. Patrascioiu, M. Duocastella, J. M. Fernández-Pradas, J. L. Morenza, and P. Serra, "Liquids microprinting through a novel film-free femtosecond laser based technique," *Appl. Surf. Sci.* **257**, 5190–5194 (2011).
9. M. Duocastella, J. M. Fernández-Pradas, J. L. Morenza, and P. Serra, "Time-resolved imaging of the laser forward transfer of liquids," *J. Appl. Phys.* **106**, 084907 (2009).
10. V. Dinca, A. Patrascioiu, J. M. Fernández-Pradas, J. L. Morenza, and P. Serra, "Influence of solution properties in the laser forward transfer of liquids," *Appl. Surf. Sci.* **258**, 9379–9384 (2012).
11. Y. Lin, G. Huang, Y. Huang, T.-R. J. Tzeng, and D. Chrisey, "Effect of laser fluence in laser assisted direct writing of human colon cancer cell," *Rapid Prototyp. J.* **16**, 202 – 208 (2010).
12. S. Catros, B. Guillotin, M. Bacáková, J.-C. Fricain, and F. Guillemot, "Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting," *Appl. Surf. Sci.* **257**, 5142–5147 (2011).
13. A. Muhammad, E. Pages, A. Ducom, A. Fontaine, and F. Guillemot, "Controlling laser-induced jet formation for bioprinting mesenchymal stem cells with high viability and high resolution," *Biofabrication* **6**, 045001 (2014).
14. J. Eggers, "Nonlinear dynamics and breakup of free-surface flows," *Reviews of modern physics* **69**, 865 (1997).
15. L. Rayleigh, "On the capillary phenomena of jets," *Proc. R. Soc. London* **29**, 71–97 (1879).
16. A. CASNER, "Déformations, manipulations et instabilités d'interfaces liquides induites par la pression de radiation d'une onde laser," *Fluid Dynamics, Université Sciences et Technologies, Bordeaux I* (2002).
17. E. G. Gamaly, A. V. Rode, B. Luther-Davies, and V. T. Tikhonchuk, "Ablation of solids by femtosecond lasers: Ablation mechanism and ablation thresholds for metals and dielectrics," *Phys. Plasmas* **9**, 949 (2002).



## 4. Bioimpression par laser femtoseconde sans couche absorbante

Le quatrième chapitre présente les résultats expérimentaux de bioimpression par laser femtoseconde sans utiliser de couche absorbante sur la lame donneuse. Tout d'abord, les valeurs des caractéristiques des bioencres sont résumées (spectres d'absorbance, viscosités et tensions de surface). Puis, l'influence de l'ouverture numérique est étudiée par évolution temporelle de la hauteur du jet, des vitesses et des accélérations instantanées. Aussi, la variation de l'ouverture numérique est analysée lors de la variation de la distance d'impression grâce aux diamètres et volumes des gouttes imprimées. Ensuite, la variation de l'ouverture numérique est étudiée en particulier à la distance d'impression  $h_{\max}$ . Enfin, le rôle des aberrations sphériques lors de la variation de l'ouverture numérique est abordé. Dans une dernière partie, on a observé l'effet de la variation de la position de focalisation sur les jets induits par laser.

<b>4. Bioimpression par laser femtoseconde sans couche absorbante .....</b>	<b>113</b>
<b>4.1. Caractérisation des bioencres .....</b>	<b>115</b>
4.1.1. Spectres d'absorption .....	115
4.1.2. Caractéristiques rhéologiques des bioencres .....	116
<b>4.2. Etude de l'influence de l'Ouverture Numérique.....</b>	<b>118</b>
4.2.1. Evolution temporelle de la hauteur du jet induit par laser .....	118
4.2.2. Evolution temporelle des vitesses et accélérations instantanées du jet induit par laser	126
4.2.3. Influence de la distance d'impression et de l'Ouverture Numérique sur les diamètres et volumes imprimés.....	129
4.2.4. Influence de l'Ouverture Numérique sur $h_{max}$ , sur le diamètre et le volume imprimés	134
4.2.5. Rôle des aberrations sphériques pour les Ouvertures Numériques utilisées.....	143
<b>4.3. Etude de l'influence de la position de focalisation .....</b>	<b>146</b>
4.3.1. Description .....	146
4.3.2. Résultats expérimentaux.....	151
4.3.3. Discussion.....	152
<b>4.4. Conclusion.....</b>	<b>155</b>
4.4.1. Discussion générale.....	155
4.4.2. En résumé.....	156

## 4.1. Caractérisation des bioencres

---

### 4.1.1. Spectres d'absorption

Nous avons cherché à déterminer si les bioencres absorbaient de la même façon la longueur d'onde laser (1030 nm) en mesurant les spectres d'absorbance des bioencres. En effet, la mesure de spectres identiques à la longueur d'onde laser indiquerait que l'on ne pourrait imputer à l'absorbance des différences de résultats entre les bioencres. Nous avons mesuré l'absorbance sur un large spectre de longueurs d'ondes (300 nm à 1200 nm) de façon à caractériser les bioencres pour une future utilisation des bioencres avec d'autres longueurs d'onde laser dans notre équipe de recherche.

Ainsi, les spectres d'absorbance pour les bioencres A, B et E de la bioimpression sans couche absorbante ont été mesurés et sont présentés ci-dessous.

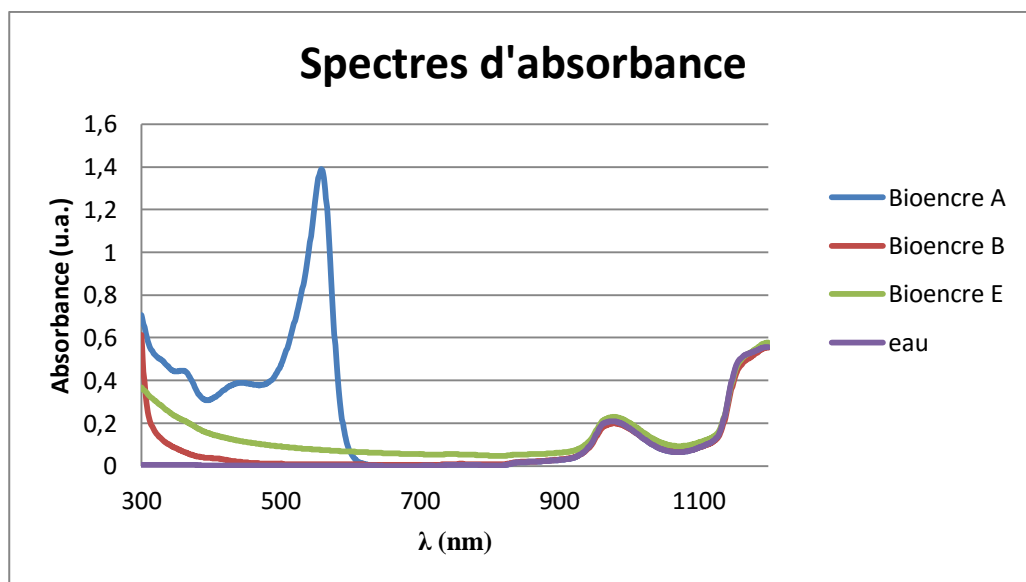


Figure 46 : Spectres d'absorbance pour les bioencres de la bioimpression sans couche absorbante (pour 1 cm d'épaisseur traversée).

Différents pics d'absorbance sont visibles sur les spectres :

- pour la bioencre A, à 555 nm



- pour la bioencre B, à 970 nm et l'absorbance augmente vers 300 nm et vers 1200 nm
- pour la bioencre E, à 970 nm et l'absorbance augmente vers 300 nm et vers 1200 nm
- pour l'eau, à 970 nm et l'absorbance augmente vers 1200 nm

Ainsi, on remarque que les spectres d'absorbance des bioencres B et E sont très similaires au spectre de l'eau sur la gamme de longueurs d'onde observées (300 nm à 1200 nm).

A partir de ces spectres, nous nous sommes intéressés à la valeur d'absorbance à la longueur d'onde laser employée de 1030 nm :

Tableau 4-1 : Absorbance (unités arbitraires pour 1 cm d'épaisseur traversée) des bioencres à 1030 nm, la longueur d'onde laser.

Bioencre ou solution	Absorbance (unité arbitraires) à 1030 nm
Bioencre A	0,107
Bioencre B	0,11
Bioencre E	0,136
eau	0,107

Les différents spectres ne présentent pas de pic d'absorbance à la longueur d'onde laser utilisée (1030 nm).

#### 4.1.2. Caractéristiques rhéologiques des bioencres

Les caractéristiques rhéologiques des bioencres ont été étudiées car elles définissent le comportement de ces liquides sous l'action de contraintes. Dans le cas de

la bioimpression, la contrainte est provoquée par la bulle de cavitation induite par l'impulsion laser. Parmi les nombreux paramètres rhéologiques, la littérature de la bioimpression a identifié la viscosité et la tension de surface comme paramètres importants, pouvant expliquer le comportement du jet de l'impression [1]. La formation du jet a été reliée à la dynamique de la bulle de cavitation [2,3]. Aussi, la croissance de la bulle de cavitation, à l'origine du jet de l'impression, dépend principalement de la viscosité et de la tension de surface du liquide [4,5].

Ainsi, les caractéristiques rhéologiques des bioencres utilisées pour la bioimpression sans couche absorbante sont résumées ci-dessous:

Tableau 4-2 : Composition et propriétés physiques (à 20°C) des bioencres pour la bioimpression sans couche absorbante.

Bioencre	Composition	Viscosité (mPa. s)	Tension de Surface (mN/m)	Densité
A	Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM)	1,28	73,5 ± 0,8	1,0084
B	90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 15mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA)	1,5	55,6 ± 0,6	1,0247
E	1% (w/v) sodium alginate + 90% (v/v) d'eau + 10% (v/v) de glycérol + 2mg/ml de dodécylsulfate de sodium (SDS)	19	34,4 ± 0,5	1,0257

Les bioencres A et B présentent des viscosités similaires tandis que la bioencre E est environ 13 fois plus visqueuse. Les tensions de surfaces, quant à elles, ont la même progression décroissante (de la bioencre A vers la bioencre B et de la bioencre B vers la bioencre E).

## 4.2. Etude de l'influence de l'Ouverture Numérique

---

Nous avons fait varier l'ouverture numérique de l'objectif de focalisation lors de la bioimpression car ce paramètre est important lors de l'interaction entre la bioencres et le laser. Souvent, d'une étude à l'autre de la littérature ([6–8]), l'ouverture numérique varie et l'énergie est donnée comme paramètre qualifiant l'interaction laser-matière. Cependant, une même énergie et deux ouvertures numériques différentes mènent à des résultats de bioimpression différents. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier l'ouverture numérique. De plus, à notre connaissance, ce type d'étude manquait dans la littérature.

En augmentant l'ouverture numérique, la fluence, ou densité d'énergie surfacique devrait être augmentée et provoquer une impression de plus grands diamètres et volumes de gouttes et mener à des vitesses et des accélérations plus importantes qu'une ouverture numérique faible ( $ON=0,26$ ).

### 4.2.1. Evolution temporelle de la hauteur du jet induit par laser

#### Description

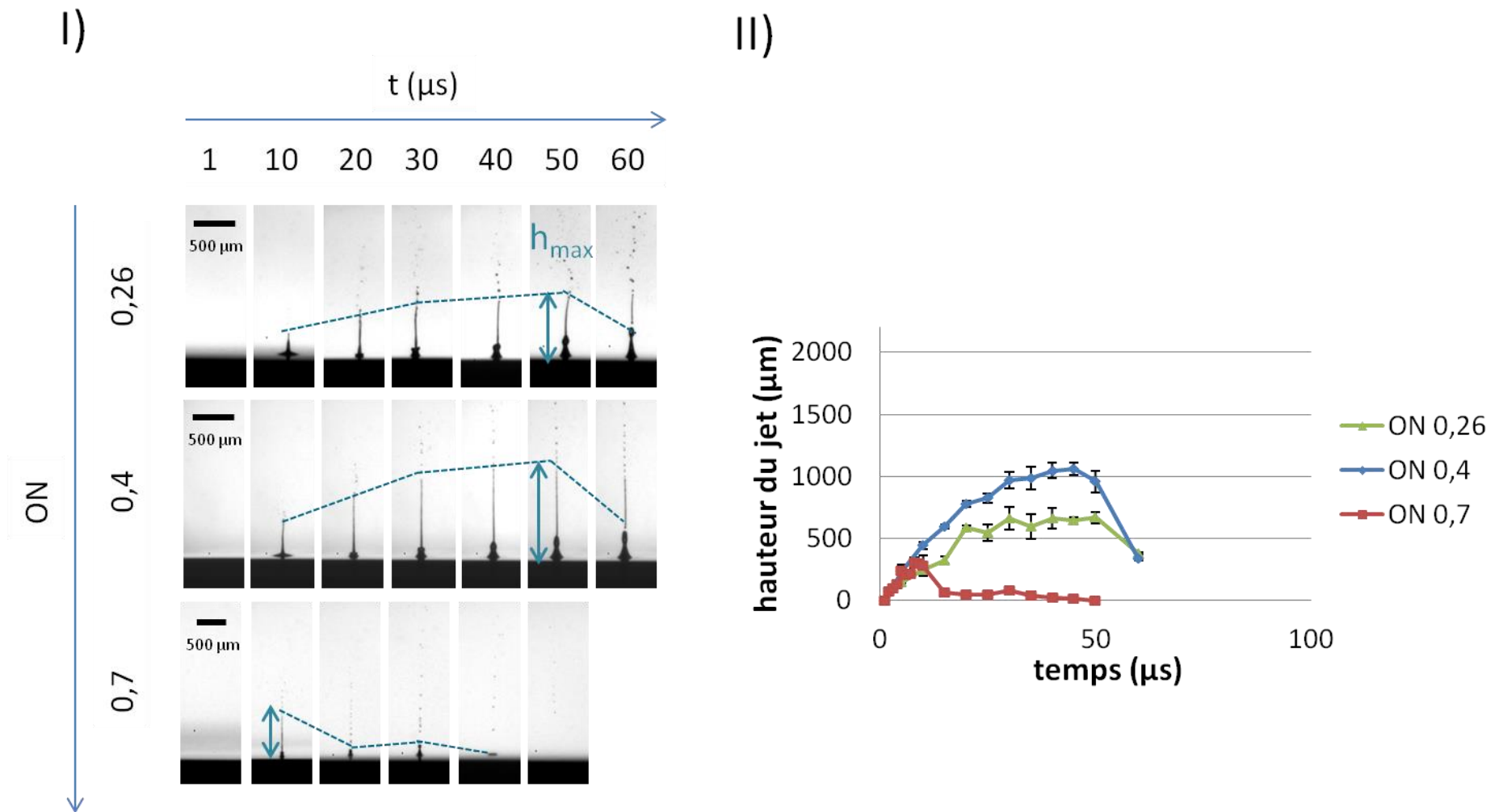
Dans le but de développer la bioimpression par laser pour des applications biologiques, une survie cellulaire de 100 % est souhaitée lors de l'impression. La maximisation de la survie cellulaire correspond à une vitesse minimale du jet lors de l'impact d'impression. En effet, pour éviter d'importantes contraintes de cisaillement sur la goutte chargée en cellules lors de l'impact d'impression, il est important de minimiser la vitesse à laquelle celle-ci arrive sur le substrat [9]. Or cette vitesse minimale proche de zéro est atteignable à une distance d'impression correspondant à la hauteur maximale du jet  $h_{max}$ , dans la configuration d'un montage expérimental imprimant du bas (donneur) vers le haut (receveur). Ainsi, des expériences de génération de jets induits par laser ont été réalisées afin de déterminer la hauteur maximale du jet  $h_{max}$  sous chaque condition expérimentale.

Notre montage expérimental permettait de faire varier deux paramètres : l'ouverture numérique et la bioencre. Trois bioencres ainsi que trois ouvertures numériques ont été étudiées et les résultats sont présentés en Figure 47, Figure 48 et Figure 49 sous forme I) d'images résolues en temps et II) de graphique de la hauteur du jet en fonction du temps. Les valeurs des hauteurs de jet maximales  $h_{\max}$  et des temps d'observation de  $h_{\max}$  sont présentées Tableau 4-3 et Tableau 4-4.

L'énergie était fixée à 10  $\mu\text{J}$  car cette énergie permettait de générer un jet dont la hauteur maximale est toujours comprise dans le champ de la caméra pour toutes nos conditions expérimentales, en particulier pour la condition générant le jet le plus haut de 2090  $\mu\text{m}$  avec la bioencre E et l'ON de 0,26.

Le temps a été varié entre 1  $\mu\text{s}$  et 210  $\mu\text{s}$  selon les conditions expérimentales. Le but était d'observer la croissance puis la décroissance du jet, en ne prenant en compte que sa partie continue exempte de toute goutte se détachant du jet. Seule la partie continue du jet a été mesurée car l'impression avec un jet continu sans gouttes est plus précise : elle permet de s'affranchir des gouttes « satellites », de diamètre plus faible qui peuvent être imprimées à côté de la goutte principale [2,10]. La partie continue du jet, prise en compte lors des mesures de jets, est représentée par la limite en pointillés sur la Figure 47.

De plus, nous rappelons que chaque image TRI correspondait à une expérience de génération de jet. Ainsi, les évolutions temporelles sont composées d'images issues d'expériences différentes. Elles donnent néanmoins une bonne approximation de l'évolution temporelle du jet généré lors d'une expérience car les images obtenues étaient reproductibles (cf. Figure 52 mesurant les hauteurs de jets obtenues dans les Figure 47, Figure 48 et Figure 49 avec un écart type compris entre 44  $\mu\text{m}$  soit 4 % de la hauteur du jet et 200  $\mu\text{m}$  soit 30 % de la hauteur du jet).



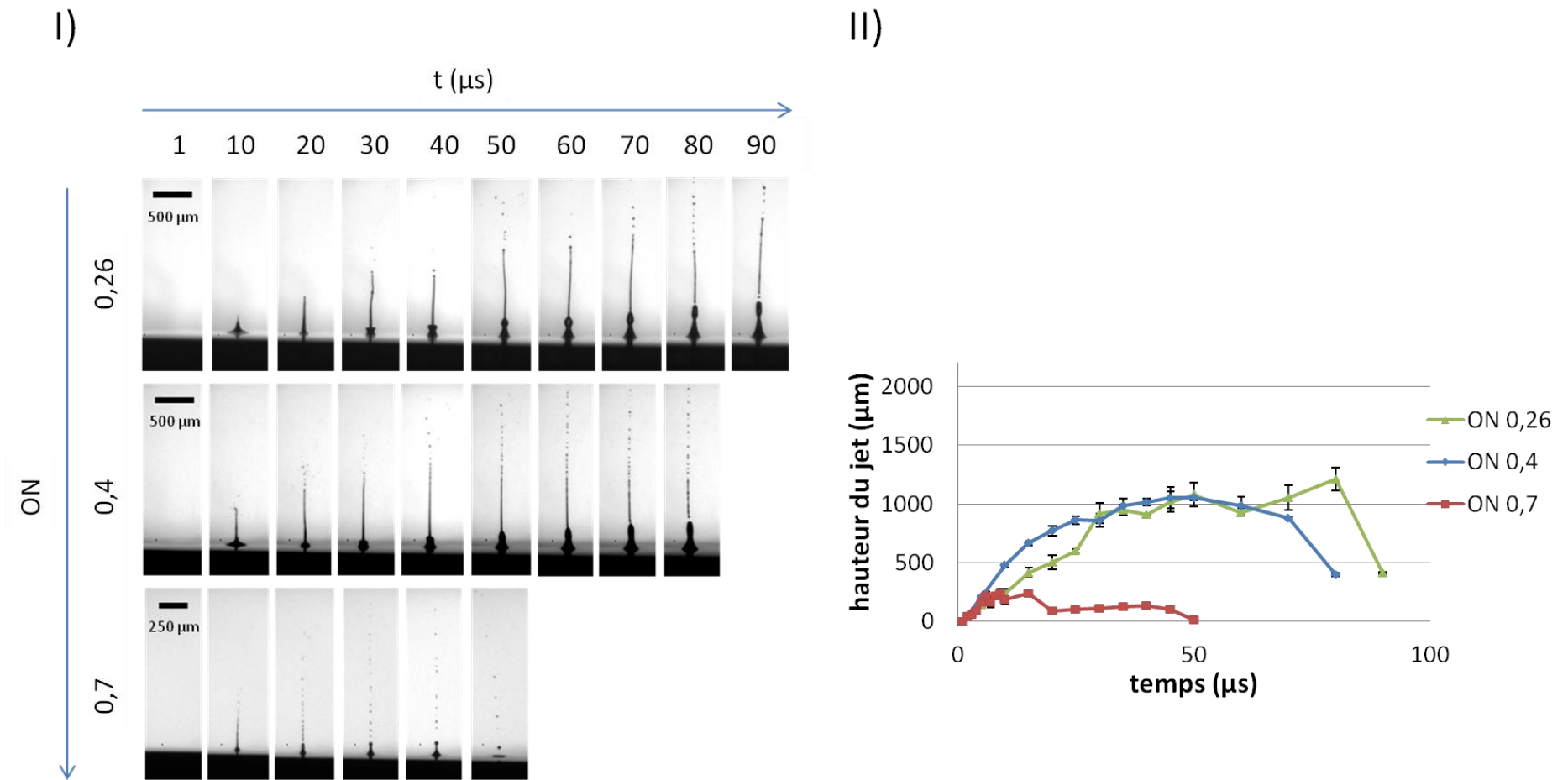


Figure 48 : I) Images résolues en temps de l'évolution temporelle du jet induit par laser à 10  $\mu\text{J}$  pour la bioencre B et une Ouverture Numérique (ON) de 0,26 à 0,7 (extrait de [11]). II) Hauteur du jet mesurée sur les images de I) en fonction du temps.

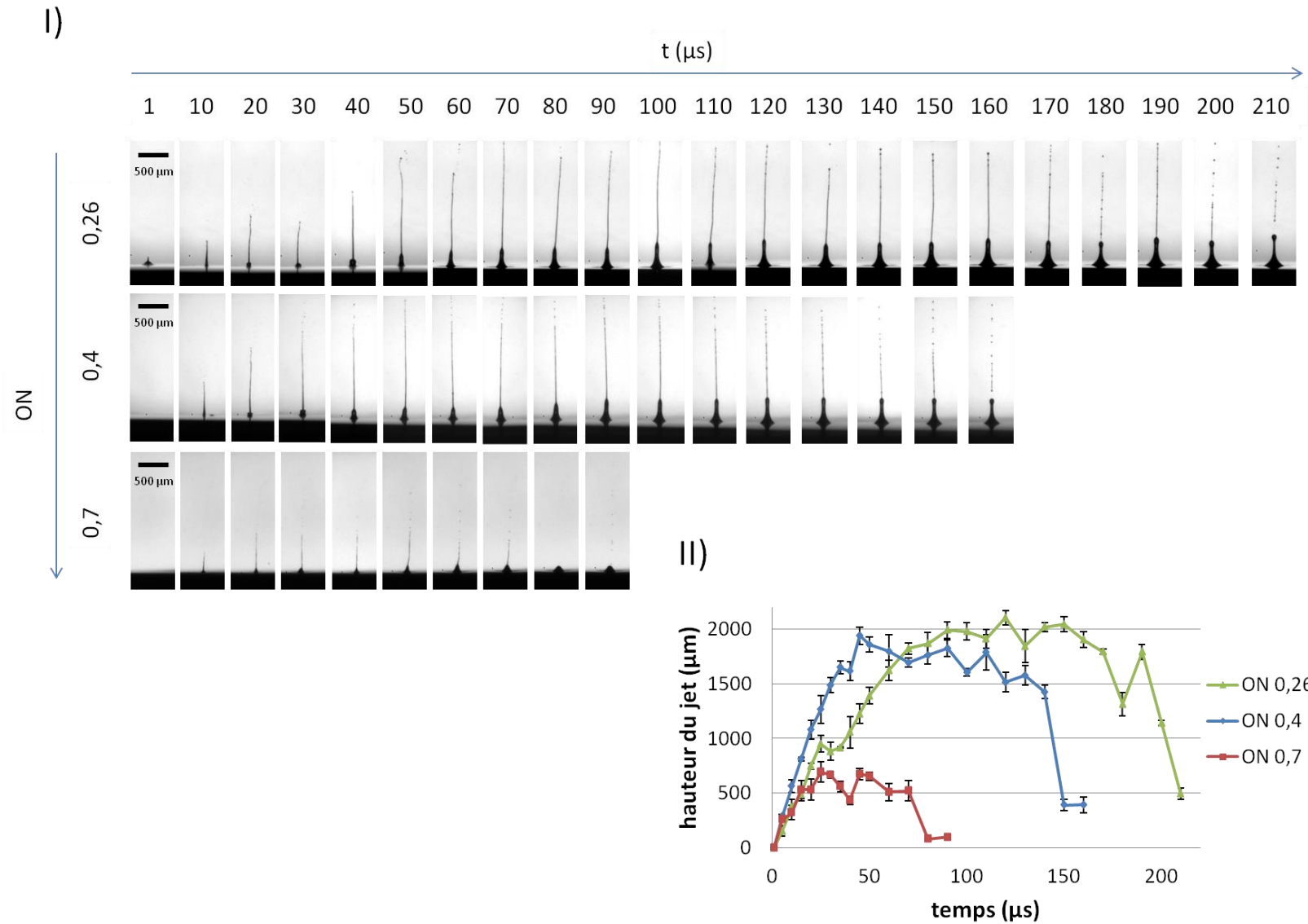


Figure 49: I) Images résolues en temps de l'évolution temporelle du jet induit par laser à  $10\text{ }\mu\text{J}$  pour la bioencre E et une Ouverture Numérique (ON) de 0,26 à 0,7. II) Hauteur du jet mesurée sur les images de I) en fonction du temps.

Tableau 4-3 :  $h_{\max}$  pour les différentes bioencres et Ouvertures Numériques à 10  $\mu\text{J}$  (données extraites de [11,12]).

$h_{\max} (\mu\text{m})$			
ON	0,26	0,4	0,7
<b>Bioencre A</b>	667	1057	305
<b>Bioencre B</b>	1211	1053	241
<b>Bioencre E</b>	2102	1937	694

Tableau 4-4 : Temps où  $h_{\max}$  est atteint pour les différentes bioencres et Ouvertures Numériques à 10  $\mu\text{J}$ .

$T (h_{\max}) (\mu\text{s})$			
ON	0,26	0,4	0,7
<b>Bioencre A</b>	50	45	8
<b>Bioencre B</b>	80	50	9 et 15
<b>Bioencre E</b>	120	45	25

## Résultats expérimentaux

### Hauteur maximale de jet $h_{\max}$

La hauteur maximale du jet  $h_{\max}$  est la plus importante pour les trois bioencres à l'ON 0,4. Ainsi, cette ON semble la plus adaptée à la génération de jets les plus hauts pour la bioimpression.

De plus,  $h_{\max}$  varie pour les bioencres à une même ON :

- $h_{\max}$  est plus haut pour la bioencre E comparé aux autres bioencres
- les valeurs de  $h_{\max}$  sont proches pour les bioencres A et B et les ON 0,4 et 0,7 (respectivement 1057  $\mu\text{m}$  et 1053  $\mu\text{m}$  à ON 0,4 et 305  $\mu\text{m}$  et 241  $\mu\text{m}$  à ON 0,7)



## **Temps d'observation de la hauteur maximale de jet $T(h_{\max})$**

La hauteur maximale du jet  $h_{\max}$  est atteinte plus rapidement pour l'ON 0,7 que pour les ON 0,4 et 0,26 pour les trois bioencres. Cependant, la différence entre l'instant où  $h_{\max}$  est atteint pour l'ON 0,26 et l'ON 0,4 est faible pour la bioencre A et s'accroît pour la bioencre B et pour la bioencre E, par ordre croissant (cf. Tableau 4-4).

En outre, le temps pour lequel  $h_{\max}$  est atteint varie en fonction de la bioencre : par ordre croissant, on trouve d'abord le temps de  $h_{\max}$  de la bioencre A puis le temps de la bioencre B et enfin le temps de la bioencre E (cf. Tableau 4-4).

## **Morphologie du jet**

La morphologie du jet est modifiée en fonction de l'ON :

- la base du jet, c'est-à dire la partie basse plus large du jet, est aussi importante pour l'ON 0,26 et l'ON 0,4
- la base du jet diminue et est plus fin pour l'ON 0,7
- de nombreuses gouttes sont générées à l'ON 0,7 pour les bioencres A, B

De plus, la morphologie du jet varie en fonction de la bioencre :

- les jets des bioencres A et B sont similaires à ON égale et sont composés d'une base (partie basse plus large du jet), d'un long jet se rompant en de nombreuses gouttes
- les jets de la bioencre E diffèrent de ceux des bioencres A et B ; ils sont caractérisés par des jets composés d'une base de jet (partie basse plus large du jet), et d'une partie continue de jet se rompant en peu de gouttes, au contraire des bioencres A et B
- des jets longs et fins avec peu de gouttes sont présents à l'ON 0,7 pour la bioencre E

## **Discussion**

### **Hauteur maximale de jet $h_{\max}$**

L'évolution temporelle du jet a déjà été observée pour différentes bioencres visqueuses par d'autres groupes : pour des impulsions nanosecondes avec une couche absorbante de titane [13], pour des impulsions femtosecondes sans couche absorbante

avec observation de la bulle de cavitation [6], pour des impulsions nanosecondes et un procédé MAPLE DW [14], pour des impulsions nanosecondes avec une couche absorbante d'or [15].

La plus grande hauteur de jet atteinte par la bioencre E semble plus liée à sa viscosité plus importante (19 mPa.s) qu'à sa tension de surface, la plus faible des bioencres (34,4 mN/m). En effet, la viscosité assure la cohésion des particules du liquide et permet ainsi au jet de se rompre moins facilement que pour les deux autres bioencres de viscosités 1,28 et 1,5 mPa.s. De plus, la rupture du jet en gouttes est expliquée classiquement par l'instabilité hydrodynamique de Rayleigh-Plateau [16]. Elle est normalement dirigée par la tension de surface du liquide, qui vise à réduire l'énergie de surface d'un système. Plus la tension de surface est grande, plus l'énergie du système est réduite et moins le jet aura tendance à se rompre en gouttes pour abaisser son énergie. Ainsi, plus la tension de surface est grande, plus la colonne du jet avant rupture en gouttes sera importante (cf. Chapitre 1, Figure 23 : Rapport d'aspect maximum d'un pont de liquide en prenant en compte l'effet de la gravité. Extrait de [17]). Or, pour la bioencre E, nous observons que la plus faible tension de surface des trois bioencres mène aux jets les plus hauts. Ainsi, on peut penser que la tension de surface a été variée dans des proportions trop faibles pour voir son effet sur la hauteur du jet maximal et que les variations de viscosité de bioencre sont responsables de la plus importante hauteur de jet de la bioencre E.

En outre, la plus grande hauteur de jet pour la bioencre la plus visqueuse a été observée pour la bioimpression sans couche absorbante de façon similaire à la bioimpression avec couche absorbante.

### **Temps d'observation de la hauteur maximale de jet $T(h_{\max})$**

Les temps pour lesquels  $h_{\max}$  est atteinte varient en fonction des propriétés des bioencres : ils sont croissants quand la viscosité augmente et que la tension de surface diminue. Comme deux paramètres de la bioencres varient (viscosité et tension de surface) il est difficile de déterminer de façon définitive quel paramètre engendre la diminution du temps d'observation de  $h_{\max}$ . Cependant, si on compare les bioencres A et B toutes ON confondues, où la viscosité varie peu (1,28 mPa.s à 1,5 mPa.s) et où la tension de surface varie de façon standard (de 73,5 mN/m à 55,6 mN/m), on remarque que les temps de  $h_{\max}$  sont peu modifiés (cf. Tableau 4-4). A l'inverse, en comparant les bioencres B et E, où la viscosité varie de façon importante (1,5 mPa.s à 19 mPa.s) et la tension de surface varie de façon standard (de 55,6 mN/m à 34,4 mN/m), on remarque que les temps de  $h_{\max}$  sont grandement modifiés (cf. Tableau 4-4). Ainsi, on peut

supposer que la viscosité a plus d'influence que la tension de surface dans la modification de ce temps d'observation de  $h_{\max}$ .

### **Morphologie du jet**

La morphologie du jet a déjà été observée pour différentes bioencres visqueuses par d'autres groupes : par LIFT avec une couche absorbante avec l'observation de la bulle de cavitation et des modélisations du comportement du liquide [18], pour des impulsions femtosecondes sans couche absorbante dans une cuve de liquide [19], pour des impulsions nanosecondes et un procédé MAPLE DW [14], par LIFT nanoseconde avec couche absorbante de titane avec l'étude de la vitesse des jets [20].

Les jets sont les plus fins pour la bioencre E, qui est la bioencre la plus visqueuse et ayant la plus faible tension de surface. La forte viscosité a été corrélée avec la finesse des jets précédemment [21]. Comme les jets sont plus fins, on peut supposer que moins de matière est déplacée et donc que le volume imprimé sera moindre avec cette bioencre. De la même façon, on peut supposer que le volume imprimé pour l'ON de 0,7 sera moindre comparé aux autres ON étant donné les jets plus fins observés.

#### **4.2.2. Evolution temporelle des vitesses et accélérations instantanées du jet induit par laser**

##### **Description**

Les vitesses et accélérations instantanées des jets ont été calculées sur la Figure 50, à partir de la hauteur des jets mesurée en Figure 47, Figure 48, Figure 49.

Les vitesses ou accélérations négatives indiquent un changement d'évolution du jet : le jet diminue après avoir grandit et le jet décélère après avoir accéléré.

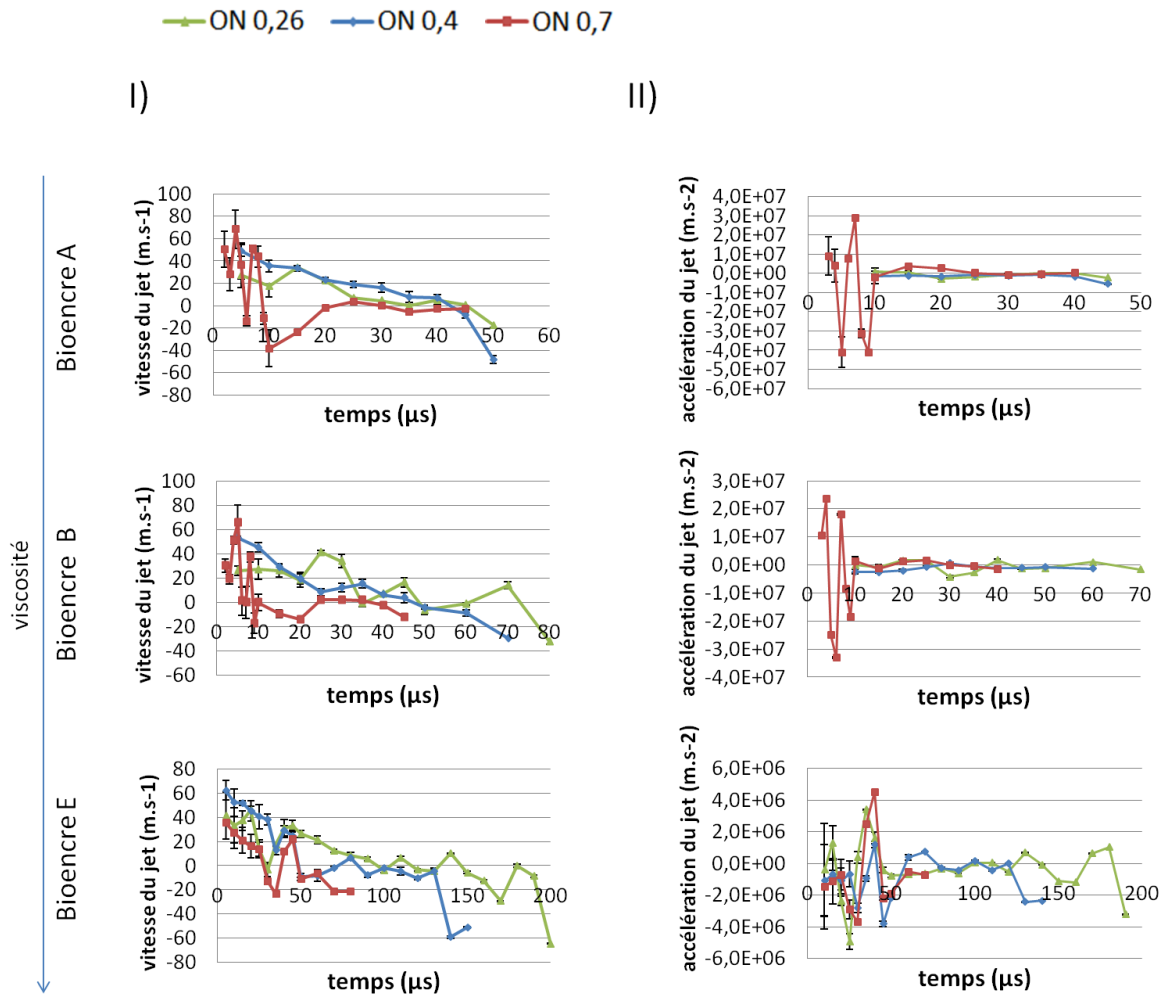


Figure 50 : Vitesses (I) et accélérations (II) du jet en fonction du temps pour les différentes bioencres à 10  $\mu\text{J}$ .

## Résultats expérimentaux

Les vitesses évoluent différemment selon l'ON. Le Tableau 4-5 résume les valeurs des vitesses et des accélérations selon l'ON. Les vitesses subissent plus de variations de signe à l'ON 0,7 qu'aux autres ON pour toutes les bioencres *i.e.* la hauteur du jet augmente puis diminue plus de fois pour l'ON 0,7.

Les vitesses de montée du jet sont les plus élevées pour les ON supérieures (46 m/s et 68 m/s respectivement de l'ON 0,26 à l'ON 0,7) et, à l'inverse, les vitesses de descente du jet sont supérieures pour les ON les plus basses (65 m/s et 38 m/s respectivement de l'ON 0,26 à l'ON 0,7).

De plus, les valeurs minimales observées sont des vitesses nulles ou très faibles de 2 m/s. Par ailleurs, les vitesses aux temps des  $h_{\text{max}}$  (cf. Tableau 4-4) sont : soit proches de 0, soit sont suivies à  $t_{i+1}$  d'une vitesse proche de 0.

Les accélérations lors de l'augmentation ou de la baisse de la vitesse sont supérieures pour l'ON 0,7 aux autres ON d'un ordre de grandeur ( $3,4 \cdot 10^6 - 4,9 \cdot 10^6 \text{ m/s}^2$  et  $2,9 \cdot 10^7 - 4,1 \cdot 10^7 \text{ m/s}^2$  respectivement pour l'ON 0,26 et l'ON 0,7). Les accélérations subissent plus de variations de signe à l'ON 0,7 qu'aux autres ON pour toutes les bioencres *i.e.* la vitesse du jet augmente puis diminue plus de fois pour l'ON 0,7.

Enfin, les valeurs minimales d'accélérations observées sont de l'ordre de  $10^4$  ou  $10^5 \text{ m/s}^2$ .

Tableau 4-5 : Gammes de vitesses et d'accélérations selon l'ON. Les valeurs négatives sont représentées par la descente du jet (vitesse) et par la baisse de la vitesse (accélération).

	Montée du jet	Descente du jet ( $v < 0$ )	Augmentation de la vitesse	Baisse de la vitesse ( $a < 0$ )
ON	$v \text{ (m/s)}$	$v \text{ (m/s)}$	$a \text{ (m/s}^2\text{)}$	$a \text{ (m/s}^2\text{)}$
<b>0,26</b>	0 à 46	0 à 65	$6,9 \cdot 10^5$ à $3,4 \cdot 10^6$	$6,9 \cdot 10^5$ à $4,9 \cdot 10^6$
<b>0,4</b>	2 à 62	2 à 59	$8,3 \cdot 10^5$ à $1,2 \cdot 10^6$	$8,3 \cdot 10^5$ à $5,5 \cdot 10^6$
<b>0,7</b>	2 à 68	2 à 38	$3 \cdot 10^4$ à $2,9 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^4$ à $4,1 \cdot 10^7$

## Discussion

Les valeurs de vitesses et d'accélérations calculées correspondent aux ordres de grandeur de certains travaux de la littérature. En effet, Muhammad *et al.* [22] ont obtenu des vitesses instantanées d'au maximum 100 m/s à 21  $\mu\text{J}$  pour un procédé de bioimpression par laser nanoseconde avec couche absorbante. De plus, les modélisations de Wang *et al.* [23] prédisent une vitesse atteignant de 40 à 100 m/s au début de la période d'expansion de la bulle ( $\sim 0.1 \mu\text{s}$ ). Aussi, Hopp *et al.* [24] ont observé une décélération de  $10^6 \text{ g}$  ( $\sim 10^7 \text{ m.s}^{-2}$ ), qui est du même ordre de grandeur que l'accélération observée lors de la diminution de la vitesse dans notre étude.

Dans certaines études, des accélérations supérieures ont été obtenues: Wang *et al.* [23] ont modélisé une accélération pouvant atteindre  $10^8 \text{ m/s}^2$  à  $10^9 \text{ m/s}^2$  au début de

la période d'expansion de la bulle ( $\sim 0.1 \mu\text{s}$ ). De plus, Hopp *et al.* [24] ont observé une accélération de  $10 \times 10^6 \text{g}$  ( $\sim 10^8 \text{ m.s}^{-2}$ ), supérieure d'un ordre de grandeur à l'accélération lors de l'augmentation de la vitesse dans notre étude.

Les comportements globaux de la vitesse et de l'accélération, ont été modélisés précédemment : en effet, Wang *et al.* [23] ont observé que vitesse et accélération augmentaient fortement au début de l'interaction avec le laser, puis tendaient vers zéro rapidement en oscillant, après la courte période d'expansion de la bulle ( $\sim 0.1 \mu\text{s}$ ).

Par ailleurs, nous avons confirmé qu'une vitesse proche de zéro, recherchée afin de maximiser la survie cellulaire lors de l'impact d'impression, est atteinte soit aux temps des  $h_{\text{max}}$  soit au temps  $t_{i+1}$ . Ainsi, l'hypothèse disant que l'impression à une hauteur  $h_{\text{max}}$  permettrait de minimiser la vitesse du jet est confirmée.

De plus, il est intéressant de noter ici que l'ON 0,7 semble produire des jets plus rapides et avec une plus grande accélération, avec une oscillation de la vitesse et de l'accélération dans le temps qui est bien supérieure aux ON 0,26 et 0,4.

#### 4.2.3. Influence de la distance d'impression et de l'Ouverture Numérique sur les diamètres et volumes imprimés

##### **Description**

Des expériences de bioimpression ont été réalisées pour les différentes bioencres et les résultats sont présentés Figure 51. La distance d'impression entre le donneur et le receveur a été variée de 100 %  $h_{\text{max}}$  à 75 %  $h_{\text{max}}$ . Les diamètres de gouttes imprimés ont été mesurés et les volumes de gouttes ont été calculés. Pour la bioencre E à l'ON 0,7, des gouttes n'ont été observées sur le receveur que pour la distance d'impression 100%  $h_{\text{max}}$ .

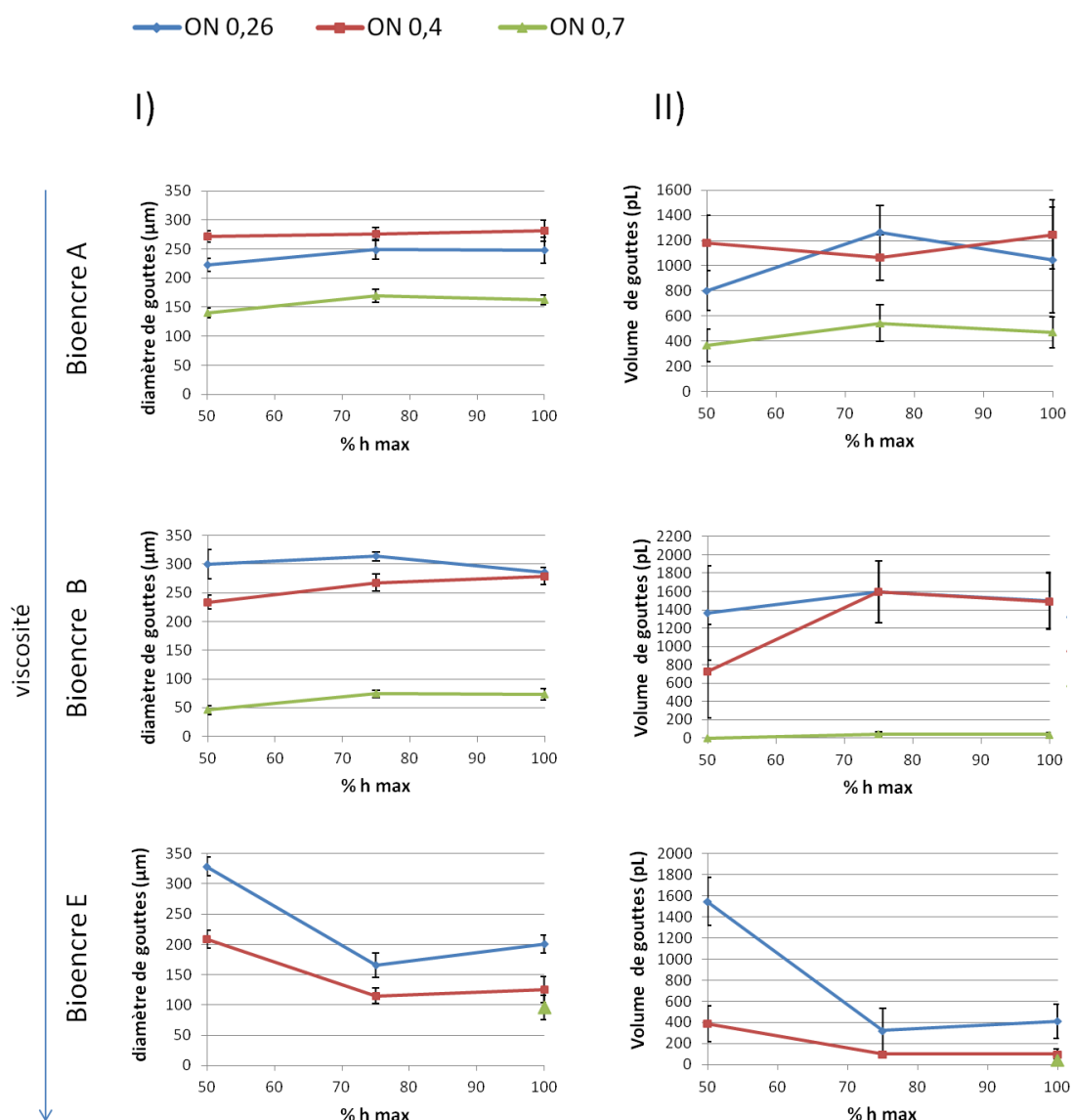


Figure 51 : Pour les bioencres A, B et E à 10 μJ : I) Diamètre de gouttes imprimées en fonction de la distance donneur-receveur. II) Volume de gouttes imprimées en fonction de la distance donneur-receveur. La distance donneur-receveur a été variée en fonction du pourcentage de la hauteur maximale ( $h_{max}$ ) correspondant à une condition expérimentale.

## Résultats expérimentaux

### Diamètre et volume de gouttes

Sur la Figure 51, les diamètres et volumes imprimés pour les trois bioencres sont ordonnés de la même façon : pour les ON 0,26 et 0,4 des valeurs supérieures sont constatées comparées à l'ON 0,7, les valeurs de l'ON 0,26 étant tantôt supérieures aux valeurs de l'ON 0,4, tantôt inférieures. Les diamètres et volumes imprimés pour l'ON 0,7 sont moindres que pour les ON inférieures pour l'ensemble des bioencres.

De plus, les diamètres imprimés pour les bioencres A et B aux  $ON < 0,7$  sont similaires mais le volume imprimé est supérieur pour la bioencre B. Aussi, les diamètres et volumes imprimés pour la bioencre E sont inférieurs (pour 75%  $h_{max}$  et 100%  $h_{max}$ ) à ceux des autres bioencres et aucune goutte n'a été observée lors de l'impression de la bioencre E à l'ON 0,7 à 50%  $h_{max}$  et à 75%  $h_{max}$ .

## Diamètres de gouttes

De plus, les diamètres augmentent avec la distance d'impression pour les bioencres A et B. En revanche, la bioencre E se comporte différemment des bioencres A et B: le diamètre diminue lorsque la distance d'impression augmente. Pour l'ensemble des conditions expérimentales, les diamètres imprimés variaient entre 46  $\mu m$  et 329  $\mu m$ .

Nous observons d'après les courbes de diamètres imprimés (cf. Figure 51) que si la distance d'impression  $d_{impression} \geq 75\% h_{max}$ , les diamètres imprimés varient peu, comparés à une distance d'impression  $d_{impression} \geq 50\% h_{max}$  et comparés à l'incertitude sur le diamètre:

- une variation maximale de 17% sur le diamètre est constatée pour des distances d'impression entre 100%  $h_{max}$  et 75%  $h_{max}$  soit 28  $\mu m$
- au contraire, pour des distances d'impression entre 100%  $h_{max}$  et 50%  $h_{max}$ , on observe 67% de variation maximale sur le diamètre soit 128  $\mu m$
- de plus, l'incertitude maximale du diamètre (25  $\mu m$ ) est proche de la variation maximale du diamètre entre 100%  $h_{max}$  et 75%  $h_{max}$  (28  $\mu m$ )

## Volumes de gouttes

Par ailleurs sur la Figure 51, les volumes augmentent globalement avec la distance d'impression pour les bioencres A et B, et le volume diminue lorsque la distance d'impression augmente pour la bioencre E. Pour l'ensemble des conditions expérimentales, les volumes imprimés variaient entre 38 pL et 1597 pL.

De plus, sur les courbes de volumes imprimés (cf. Figure 51) des observations similaires aux diamètres peuvent être faites. Si la distance d'impression  $d_{impression} \geq 75\% h_{max}$ , les volumes imprimés varient peu, comparés à une distance d'impression  $d_{impression} \geq 50\% h_{max}$  et comparés à l'incertitude sur le volume:

- une variation maximale de 21% sur le volume est constatée pour des distances d'impression entre 100%  $h_{max}$  et 75%  $h_{max}$  soit 218 pL
- au contraire, pour des distances d'impression entre 100%  $h_{max}$  et 50%  $h_{max}$ , on observe 283% de variation maximale sur le volume soit 1134  $\mu m$



- de plus, l'incertitude maximale du volume (513 pL) est supérieure à la variation maximale du volume entre 100%  $h_{\max}$  et 75%  $h_{\max}$  (218 pL)

## Discussion

### Diamètre et volume de gouttes

Le phénomène d'évaporation peut expliquer certains de nos résultats :

- La bioencre B comporte du glycérol qui a une température d'évaporation supérieure à celle de l'eau (290°C contre 100 °C sous pression atmosphérique) alors que la bioencre A est similaire à l'eau pour l'évaporation, du fait de sa composition. Ainsi, la bioencre B s'évaporant moins vite que la bioencre A et la hauteur de goutte étant évaporée plus vite que son diamètre (à cause de la plus grande surface mise en jeu dans l'évaporation du diamètre que dans celui de la hauteur de goutte), il en résulte que le volume de la bioencre B est supérieur à celui de la bioencre A, pour des diamètres similaires (cf. Figure 51 aux ON<0,7).
- Les gouttes non observées pour certaines conditions (à l'ON 0,7 pour la bioencre E, 50%  $h_{\max}$  et 75%  $h_{\max}$ ) se sont probablement complètement évaporées avant observation au microscope, du fait de leur plus petites dimensions à une ON forte qu'à une ON faible.

Par ailleurs, la viscosité des bioencres peut permettre d'interpréter certains résultats :

- La bioencre E était la bioencre la plus visqueuse avec 19 mPa.s : elle a été imprimée avec des diamètres et volumes de gouttes plus petits que les autres bioencres (pour 75%  $h_{\max}$  et 100%  $h_{\max}$ ). La viscosité réduisant la mobilité du liquide, et donc la quantité de liquide déplacée par le jet induit par laser, on peut la désigner comme la cause de ces petits diamètres et volumes pour la bioencre E.

### Diamètres de gouttes

La morphologie du jet, liée à la viscosité des bioencres peut permettre d'interpréter certains résultats :

- le diamètre des gouttes imprimées avec la bioencre E diminue lorsque la distance d'impression augmente, contrairement aux bioencres A et B. En effet, la bioencre E, qui est la plus visqueuse, est caractérisée par un jet plus fin que les bioencres A et B (cf. Figure 47, Figure 48 et Figure 49). On peut supposer que le

diamètre du jet à la hauteur d'impression s'affine lorsque l'on augmente la distance d'impression pour la bioencre E alors qu'il tend à augmenter pour les bioencres A et B. Cette hypothèse n'a pu être vérifiée par des mesures de largeur de jet sur les images résolues en temps car les jets n'étaient pas assez larges sur les images pour discriminer suffisamment les variations de largeur de jet.

## **Volumes de gouttes**

De la même façon que pour les diamètres de gouttes, la morphologie du jet, liée à la viscosité des bioencres peut permettre d'interpréter la diminution du volume des gouttes imprimées avec la bioencre E lorsque la distance d'impression augmente, contrairement aux bioencres A et B (voir paragraphe précédent).

Les incertitudes sur les volumes étaient plus importantes que sur les diamètres. Ceci est dû à plusieurs facteurs :

- les incertitudes sur le volume résultent des incertitudes sur deux autres paramètres, la hauteur de la goutte et son diamètre
- la mesure de hauteur de gouttes a été réalisée sur peu de répétitions (3)
- l'évaporation joue un rôle plus important sur la variation de la hauteur de goutte que sur la variation de son diamètre (à cause de la plus grande surface mise en jeu dans l'évaporation du diamètre que dans celui de la hauteur de goutte)

De plus, ces incertitudes importantes sur les volumes expliquent que l'on n'observe pas exactement les mêmes tendances des courbes de diamètres et de volume en fonction de la distance d'impression (exemple : à l'ON 0,26 pour la bioencre A, le diamètre des gouttes augmente jusqu'à 75%  $h_{\max}$  puis se stabilise à 100%  $h_{\max}$  alors que le volume des gouttes augmente à 75%  $h_{\max}$  puis diminue à 100%  $h_{\max}$ ).

## **Seuil de reproductibilité**

Nous considérons les distances d'impression variant entre 75%  $h_{\max}$  et 100%  $h_{\max}$  comme des variations de distances générant des procédés de bioimpression reproductibles :

- d'après la variation maximale du diamètre pour des distances d'impression variant entre 75%  $h_{\max}$  et 100%  $h_{\max}$  qui est de 17 %, contre 67% pour l'ensemble des distances d'impression,

- et d'après la variation maximale du volume pour des distances d'impression variant entre 75%  $h_{\max}$  et 100%  $h_{\max}$  qui est de 21%, contre 283% pour l'ensemble des distances d'impression.

Ainsi, pour un seuil de reproductibilité de la distance d'impression à 75%  $h_{\max}$ , la distance à laquelle nous pouvons déplacer le receveur, en partant de la position  $h_{\max}$  est de :

$$(100\% - 75\%) h_{\max} = 25\% h_{\max}$$

Cette distance représente la tolérance sur la position du receveur pour imprimer de façon reproductible. Par conséquent, plus  $h_{\max}$  est grand et plus la tolérance sur la position du receveur pour imprimer de façon reproductible est grande.

Par la suite, nous allons chercher à maximiser la tolérance sur le substrat receveur de façon à paramétrer un procédé de bioimpression plus facile à régler et mettre en place pour l'opérateur. Notre critère pour déterminer l'ON optimale fut d'obtenir le plus grand  $h_{\max}$  possible pour la bioimpression sans couche absorbante.

#### 4.2.4. Influence de l'Ouverture Numérique sur $h_{\max}$ , sur le diamètre et le volume imprimés

### **Observation des jets induits par laser à $h_{\max}$**

#### **Description**

Nous avons réalisé des expériences d'imageries résolues en temps ont été réalisées pour observer les jets induits par laser à la hauteur maximale  $h_{\max}$  pour les différentes bioencres et ouvertures numériques [11]. Les hauteurs maximales ont été identifiées grâce à l'étude temporelle précédente (cf. Tableau 4-3) et sont reportées en fonction de l'ON sur la Figure 52. Les jets à la hauteur  $h_{\max}$  sont représentés sur les images résolues en temps de la Figure 53.

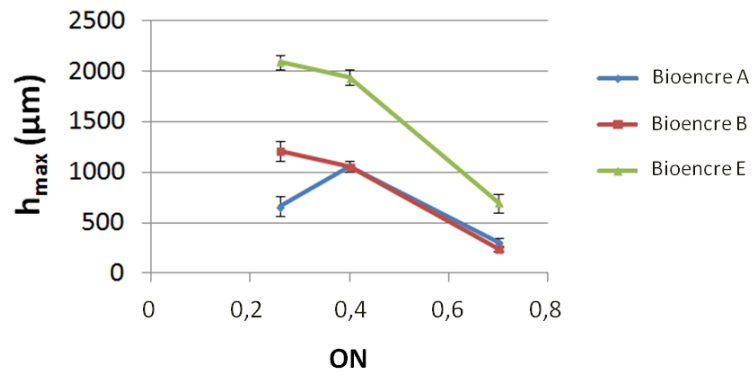


Figure 52 : Influence de l'Ouverture Numérique (ON) sur le jet de la bioimpression pour une énergie laser de  $10\mu\text{J}$ . La hauteur maximale du jet  $h_{\max}$  est donnée en fonction de l'ON pour les bioencres A, B et E (extrait de [11]).

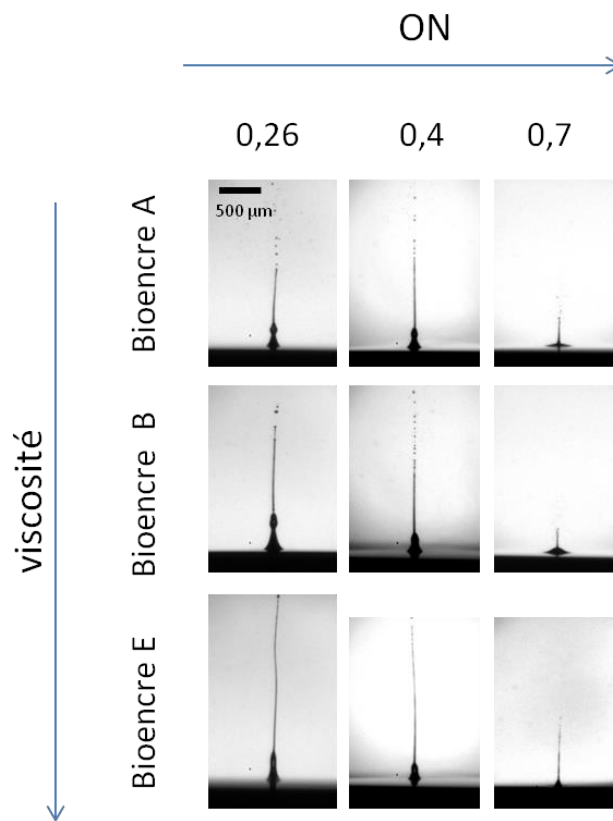


Figure 53 : Images résolues en temps du jet induit par laser à l'instant du jet de hauteur maximale ( $h_{\max}$ ) à  $10\mu\text{J}$  pour les bioencres A, B et E et avec une Ouverture Numérique (ON) de 0,26 à 0,7 (extrait de [11]).

## Résultats expérimentaux

### $H_{MAX}$

D'après la Figure 52 et pour les bioencres B et E, quand l'ON augmente de 0,26 à 0,7,  $h_{max}$  décroît respectivement de 1200  $\mu m$  à 250  $\mu m$  et de 2100  $\mu m$  à 700  $\mu m$ . La décroissance de  $h_{max}$  est plus importante pour l'ON variant de 0,4 à 0,7: les pentes sont environ 2 à 4 fois plus importantes que les pentes pour l'ON variant de 0,26 à 0,4. Sur la même figure, pour la bioencre A quand l'ON augmente de 0,26 à 0,4,  $h_{max}$  croît de 650  $\mu m$  à 1050  $\mu m$  alors que  $h_{max}$  diminue pour les deux autres bioencres.

### BASE DU JET

De plus, d'après la Figure 53, le pied du jet est haut pour de faibles ON, puis il décroît quand l'ON augmente. Par ailleurs, le pied du jet est plus large pour des bioencres de faibles viscosités (bioencres A et B) que pour la bioencre E de viscosité forte (19 mPa.s contre 1,28 mPa.s et 1,5 mPa.s). Donc, si on relie ces résultats à la Figure 52, plus le jet est haut, plus le pied du jet est grand.

## Impression des bioencres à $h_{max}$

### Description

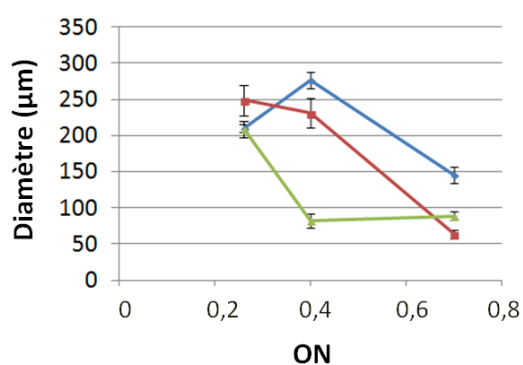
Les différentes bioencres ont été imprimées à la distance d'impression  $h_{max}$  pour les trois ouvertures numériques et les résultats sont donnés en

Figure 54, Figure 56, et Figure 55. Le Tableau 4-6 résume les distances d'impression  $h_{max}$  utilisées. La

Figure 54 présente les diamètres et volumes de gouttes imprimées dans les différentes conditions expérimentales. La Figure 55 montre les gouttes imprimées observées au microscope. Enfin, la Figure 56 est composée d'images résolues en temps du jet dans les conditions d'impression à l'instant d'impression à  $h_{max}$  avec un receveur placé en haut de l'image.

—●— Bioencre A    —■— Bioencre B    —▲— Bioencre E

I)



II)

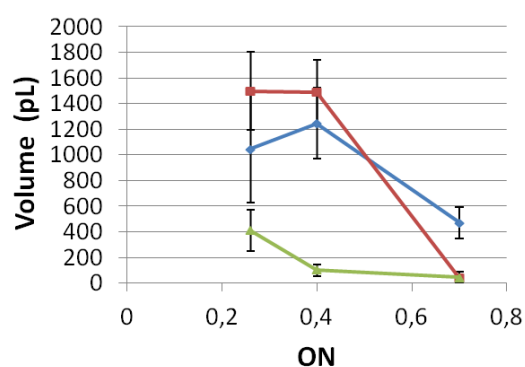


Figure 54 : Pour une énergie de 10  $\mu\text{J}$  et une distance donneur-receveur de  $h_{\text{max}}$  : I) Diamètres des gouttes imprimées en fonction de l'Ouverture Numérique (ON) et de la bioencre (données extraites de [12]). II) Volumes des gouttes imprimées en fonction de l'Ouverture Numérique (ON) et de la bioencre.

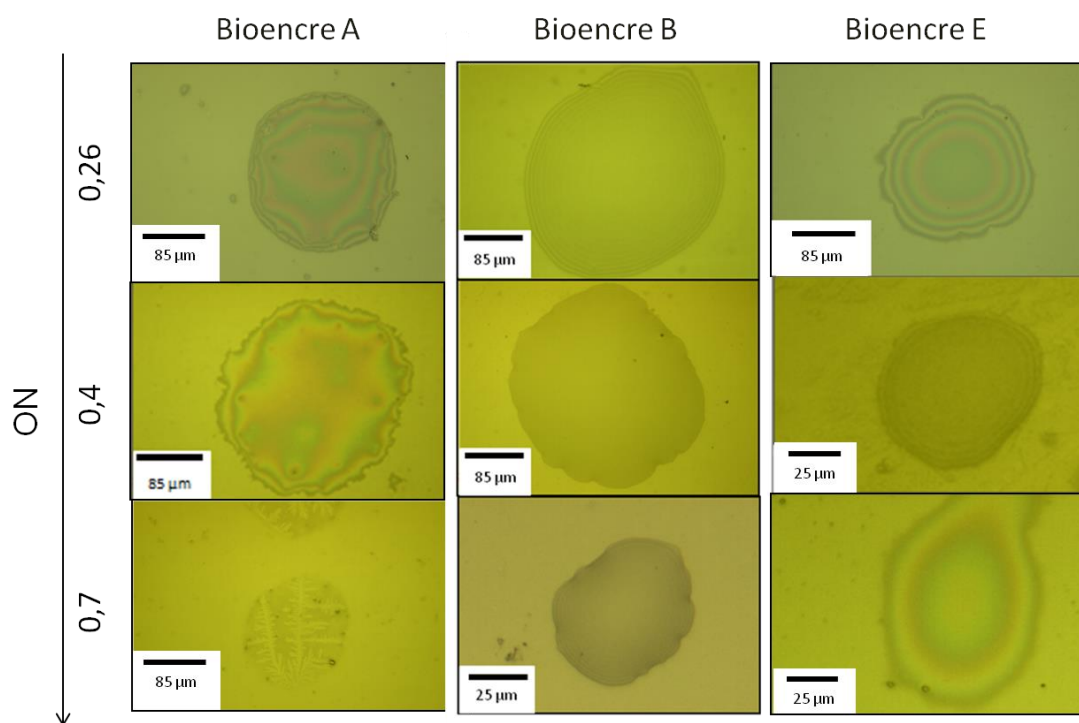


Figure 55 : Vue de dessus sous microscope des gouttes imprimées en fonction de l'Ouverture Numérique (ON) et de la bioencre pour une énergie laser de 10  $\mu\text{J}$  et une distance donneur-receveur de  $h_{\text{max}}$  (données extraites de [11]).

Tableau 4-6 : Distance donneur-receveur utilisée pour les différentes bioencres et Ouvertures Numériques à 10  $\mu\text{J}$ . La distance donneur-receveur a été déterminée à partir des valeurs de  $h_{\text{max}}$  en arrondissant à la dizaine de microns la plus proche.

Distance donneur-receveur ( $\mu\text{m}$ ) à 10 $\mu\text{J}$			
ON	0,26	0,4	0,7
<b>Bioencre A</b>	660	1060	310
<b>Bioencre B</b>	1210	1050	240
<b>Bioencre E</b>	2090	1940	690

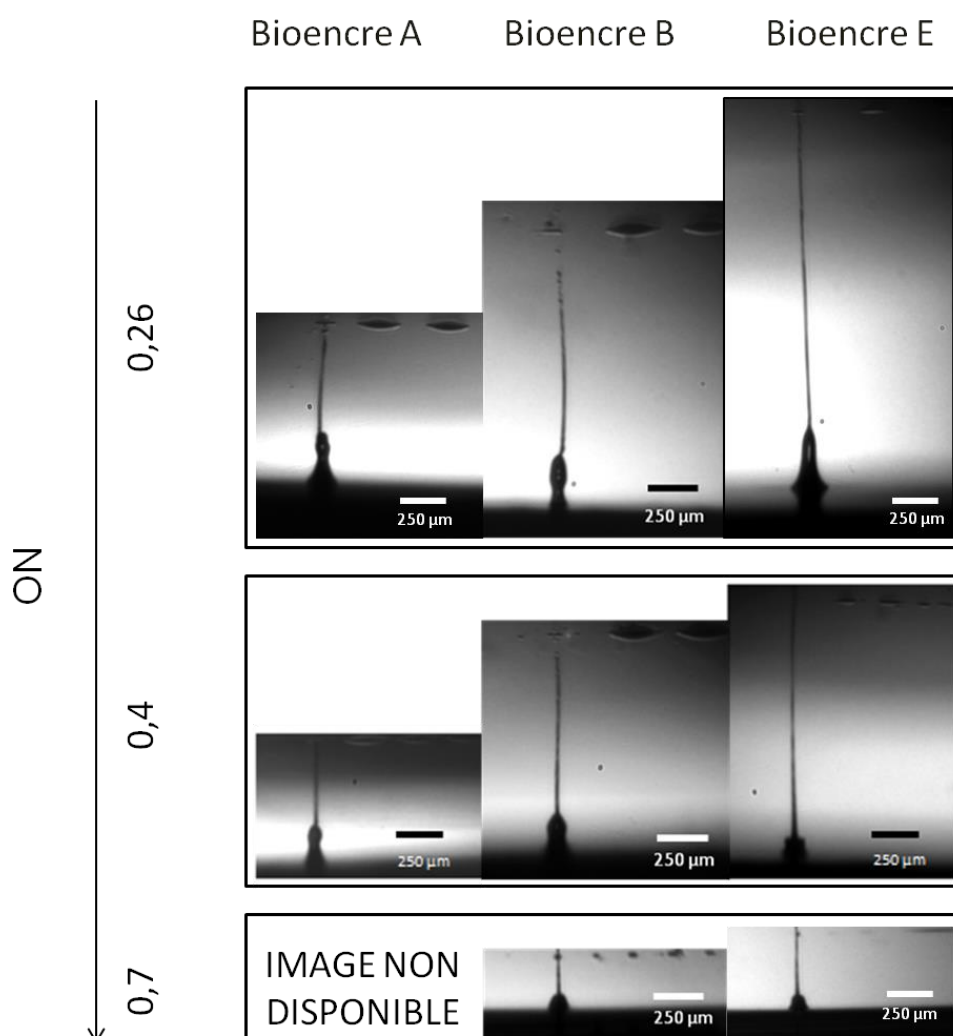


Figure 56 : Images résolues en temps du jet à l'instant d'impression avec un receveur en haut de l'image. Les images sont présentées en fonction de l'Ouverture Numérique (ON) et de la bioencre pour une énergie laser de 10 $\mu\text{J}$  et une distance donneur-receveur de  $h_{\text{max}}$  (données extraites de [11]).

## Résultats expérimentaux

### DIAMETRES ET VOLUMES IMPRIMES A $H_{MAX}$

Nous remarquons sur la

Figure 54 que les diamètres et volumes de gouttes évoluent de la même façon pour des conditions expérimentales similaires.

De plus, sur cette même figure, lorsque l'ON augmente, diamètres et volumes diminuent globalement (sauf pour la bioencre A qui connaît un maximum pour l'ON 0,4 et pour la bioencre E qui voit une stabilisation de son diamètre autour de 85  $\mu\text{m}$ , pour l'ON 0,4 et l'ON 0,7, et une diminution de son volume de 43 pL à 101 pL, respectivement pour l'ON 0,4 et l'ON 0,7).

Par ailleurs, les ouvertures numériques pour lesquelles les plus grands diamètres et volumes de gouttes sont observées sont les ON 0,26 et 0,4 :

- les diamètres évoluent de 82  $\mu\text{m}$  à 277  $\mu\text{m}$  contre des diamètres de 64  $\mu\text{m}$  à 146  $\mu\text{m}$  pour l'ON 0,7
- les volumes s'étendent de 101 pL à 1498 pL contre des volumes de 43 pL à 470 pL pour l'ON 0,7

Les diamètres et volumes des bioencres A et B sont proches pour l'ensemble des ON :

- à l'ON 0,26, les diamètres sont de 210  $\mu\text{m}$ , 249  $\mu\text{m}$ , 209  $\mu\text{m}$ , et les volumes sont de 1045 pL, 1498 pL, 411 pL, respectivement pour les bioencres A, B et E
- à l'ON 0,4, les diamètres sont de 277  $\mu\text{m}$ , 213  $\mu\text{m}$ , 82  $\mu\text{m}$ , et les volumes sont de 1247 pL, 1491 pL, 101 pL, respectivement pour les bioencres A, B et E

Les diamètres et volumes sont similaires pour les trois bioencres à l'ON 0,7 :

- à l'ON 0,7, les diamètres sont de 146  $\mu\text{m}$ , 64  $\mu\text{m}$ , 89  $\mu\text{m}$  et les volumes sont de 470 pL, 38 pL, 43 pL, respectivement pour les bioencres A, B et E

### GOUTTES IMPRIMEES A $H_{MAX}$

D'après la Figure 55, les gouttes imprimées sont quasi-circulaires et les contours des gouttes sont dentelés à cause de l'évaporation après l'impression. En outre, les franges d'interférences sont observables sur les images des gouttes.



## JETS SUR RECEVEUR A $H_{MAX}$

On remarque sur la Figure 56 que l'instant d'observation du jet, correspondant au  $h_{max}$  déterminé précédemment à 10  $\mu s$  près, ne correspond pas toujours exactement à l'instant de contact entre le jet et le receveur (par exemple, l'image à l'ON 0,26 pour la bioencre B et l'image à l'ON 0,26 pour la bioencre A).

De plus, le jet n'est pas toujours perpendiculaire au donneur (bioencre A et B à l'ON 0,26). Ceci a été également observé sur certains jets de la Figure 47, de la Figure 48 et de la Figure 49.

Aussi, les jets observés à  $h_{max}$  lors de l'impression sur receveur sur la Figure 56 sont similaires aux jets observés à  $h_{max}$  sans receveur qui sont présentés en Figure 53. La seule différence observée est pour la bioencre B et l'ON 0,7 où la base du jet est plus plat dans le cas de la Figure 53 que de la Figure 56.

## Discussion sur l'observation des jets induits par laser et l'impression des bioencres à $h_{max}$

### $H_{MAX}$

La décroissance de  $h_{max}$  observée lorsque l'ON augmente va à l'encontre du comportement standard de la lumière focalisée dans l'air :

- dans l'air, où la propagation est dénuée d'aberration sphérique, quand l'ON augmente, le diamètre du faisceau laser au point focal diminue

Tableau 4-7 : Rayon d'Airy et profondeur de champs dans l'air en fonction de l'ON.

ON	0,26	0,4	0,7
<b>Rayon d'Airy dans l'air (<math>\mu m</math>)</b>	2,4	1,6	0,9
<b>Profondeur de champs dans l'air (<math>\mu m</math>)</b>	$\pm 9,3$	$\pm 4$	$\pm 1,3$

- comme la fluence laser ou densité d'énergie augmente avec  $1/r^2$  (r, rayon du faisceau laser focalisé), l'augmentation de l'ON devrait mener à une augmentation de la fluence, elle-même source de plus quantité relative d'énergie pour la génération d'un jet de bioencre. De cette façon, la hauteur du jet devrait augmenter quand l'ON augmente. Or nous observons le contraire. Une hypothèse serait que l'aberration sphérique sur le chemin optique soit suffisamment importante aux ON les plus fortes (à ON 0,7 et

0,4). L'aberration sphérique à ces hautes ON abaisserait alors la fluence et les jets générés à ces hautes ON seraient plus petits qu'à l'ON 0,26.

#### **BASE DU JET**

D'après la Figure 53, présentant les images de jets à  $h_{\max}$  et la

Figure 54, montrant les diamètres et volumes imprimés à  $h_{\max}$  il semblerait que:

- les bases de jets « hauts » sont associées à des jets de hauteur plus importante que les bases de jets plus petits
- les bases de jets « hauts » (ou les jets de hauteur importante), génèrent des diamètres et volumes imprimés plus importants que les bases de jets plus petits (ou les « petits » jets)

#### **DIAMETRES ET VOLUMES IMPRIMES A $H_{\max}$**

La viscosité similaire des bioencres A et B, avec respectivement, 1,28 mPa.s et 1,5 mPa.s, peut expliquer que les diamètres et volumes soient similaires pour des deux bioencres et l'ensemble des ON. En effet, nous avons vu précédemment que la viscosité jouait un rôle prépondérant pour déterminer la hauteur des jets (*cf.* 0 § Hauteur maximale de jet  $h_{\max}$ ).

Par ailleurs, les diamètres et volumes similaires mesurés pour les trois bioencres à l'ON 0,7 semblent indiquer que le procédé à l'ON 0,7 est peu sensible aux différences rhéologiques des bioencres.

#### **JETS SUR RECEVEUR A $H_{\max}$**

Nous pouvons expliquer la non-perpendicularité des jets de plusieurs manières :

- par la perturbation de la surface du liquide
- par l'interaction des deux bulles de cavitation de deux jets successifs

Dans notre configuration, on rappelle que le laser est focalisé à la même position dans la bioencre (si on ne modifie pas son altitude  $z$ ). Pour répéter nos expériences, nous procédions de deux façons : effectuer un tir laser à la même position dans la bioencre après un temps d'attente (non mesuré) ou déplacer légèrement la lame donneuse pour ne pas tirer deux fois à la même position dans la bioencre.

Brasz *et al.* ont étudié, expérimentalement et par des simulations, la réaction de deux tirs lasers adjacents et décalés dans le temps sur les jets de liquide produits [25]. Ils ont observé que le second jet de liquide était dévié d'un certain angle par rapport à la perpendiculaire de la surface du liquide.

Les simulations ont montré que le premier jet perturbe l'interface air-liquide proche de lui et l'angle initial de l'interface air-liquide soumise à la seconde impulsion laser peut aider à prédire l'angle du second jet. Le premier jet se détache ou se rétracte dans le liquide et la position de ce minimum local se propage ensuite radialement vers l'extérieur. Ceci peut être compris comme la propagation d'une onde capillaire cylindrique vers l'extérieur dès que le détachement ou la rétraction du jet survient.

Nous soulignons que pour nos expériences, il n'était pas possible de former deux jets adjacents avec des délais de l'ordre de la  $\mu\text{s}$  comme dans l'étude de Brasz *et al.* (car nous ne pouvions déplacer le donneur que manuellement). Cependant, la perturbation de l'interface du liquide semble impliquée dans notre cas, d'après notre configuration expérimentale. De plus, cet effet a été constaté lors des expériences, lorsqu'une vibration était transmise au donneur, perturbant la surface et déviant les jets de la normale au donneur.

De plus, d'après l'étude de Brasz *et al.*, certains facteurs influencent l'angle de déviation du jet de liquide. Le délai entre les deux jets par exemple est fortement corrélé à cet angle de déviation. En outre, l'épaisseur du film de bioencre joue un rôle important dans l'angle de déviation du jet observé : plus elle est petite et plus les ondes capillaires ont de larges amplitudes ce qui mène à de plus grands angles de déviation.

Biver *et al.* [26] ont quant à eux montré que si deux bulles de cavitation sont suffisamment proches, elles interagissent et alors l'uniformité ou la reproductibilité des jets est diminuée. Cette situation semble possible d'après nos conditions de manipulations expérimentales et tendrait à expliquer la variabilité de la hauteur du jet (cf. barres d'incertitude sur la Figure 52).

Nous pouvons identifier plusieurs causes expliquant que le jet n'atteigne pas toujours le receveur sur les images :

- Premièrement, si le jet n'est pas droit (i.e. perpendiculaire au donneur et au receveur), il ira moins haut et sera plus susceptible de ne pas atteindre le receveur
- Deuxièmement, l'incertitude sur le temps de  $h_{\text{max}}$  pour une condition expérimentale, de  $10 \mu\text{s}$ , peut expliquer que l'instant d'observation du jet sur les images ne corresponde pas toujours exactement à la hauteur du jet maximale  $h_{\text{max}}$
- Finalement, ces causes sont exprimées dans la variabilité de la hauteur du jet, résumée par les incertitudes de mesure de jet sur la Figure 6

#### 4.2.5. Rôle des aberrations sphériques pour les Ouvertures Numériques utilisées

##### Description

La diminution de  $h_{\max}$  pour les bioencres B et E lorsque l'ON augmente de 0,26 à 0,7 peut être comprise par l'aberration sphérique dans le chemin optique. En effet, lorsque l'ON augmente à une énergie d'impulsion constante, la fluence (l'énergie par unité de surface) devrait augmenter et conduire à une énergie cinétique plus élevée dans le jet, et donc générer un jet de hauteur supérieure. Cependant, nous observons l'évolution inverse pour  $h_{\max}$ .

Le logiciel de tracé de rayons ZEMAX® (Radiant Zemax, Redmont, WA, USA) a été utilisé pour calculer l'aberration sphérique de notre système [11]. En effet, pour notre configuration où le faisceau laser monochromatique se propage suivant l'axe optique du système, la seule aberration résiduelle, est l'aberration sphérique. Elle est due aux différences de réfraction des rayons en fonction de l'ON, traversant le substrat donneur et la bioencre (épaisseur du donneur en verre de silice: 1,44 mm, épaisseur de la bioencre: 1,26 mm avec un indice optique de 1,33).

La Figure 57 montre la fraction de l'énergie encerclée (*i.e.* la fraction de l'énergie totale incluse dans un cercle) sur la surface libre de la bioencre et en fonction du rayon du faisceau depuis son centroïde. Ce paramètre permet d'évaluer la qualité de la focalisation.

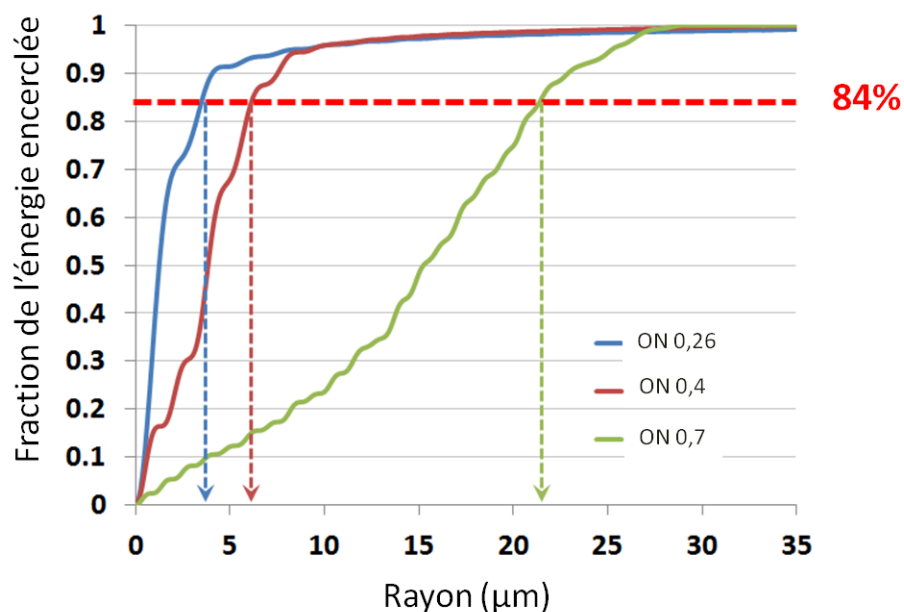


Figure 57 : Energie radiale encerclée, incidente sur la surface libre de la bioencres pour chaque Ouverture Numérique (ON), illustrant l'effet de l'aberration sphérique sur le faisceau due au substrat donneur (verre et bioencres). Les rayons contenant 84% de l'intensité lumineuse diffractée sont donnés par les flèches verticales (extrait de [11]).

## Résultats expérimentaux

Le critère qui a été utilisé pour définir le diamètre des tâches au point focal correspond aux 84% d'intensité lumineuse diffractée contenus dans l'anneau central de la tâche d'Airy. Grâce à ce critère, on peut voir sur la Figure 57 que les diamètres des tâches au point focal de notre système et sur la surface libre de la bioencres sont de 7  $\mu\text{m}$  (proche de diffraction limite), 12  $\mu\text{m}$  et 43  $\mu\text{m}$ , respectivement, pour les ON de 0,26, 0,4 et 0,7. Nous rappelons que les diamètres de faisceau dans l'air (voir le Tableau 4-7) sont de 5  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$  et 2  $\mu\text{m}$ , respectivement pour les ON de 0,26, 0,4 et 0,7.

## Discussion

Comme d'après les simulations Zemax, les diamètres du faisceau sont modifiés et augmentés par rapport à une propagation dans l'air, sous l'effet de l'aberration sphérique (7  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$  et 43  $\mu\text{m}$ , respectivement, pour les ON de 0,26, 0,4 et 0,7), la fluence diminue lorsque l'ON augmente. La fluence diminuant, l'énergie cinétique du jet est réduite, et donc un jet de plus faible hauteur est généré quand l'ON augmente. Ainsi, la présence des aberrations sphériques explique la diminution de  $h_{\text{max}}$  avec l'augmentation de l'ON de la Figure 52. De plus, ceci explique la diminution de la hauteur des jets pour l'ON de 0,7, comparée aux autres ON, en Figure 47, Figure 48 et Figure 49.

Par ailleurs, la courbe temporelle des hauteurs de jets à l'ON 0,4 est supérieure à la courbe à l'ON 0,26 pour la bioencres A, Figure 47. Nous n'avons pas d'explication à ce phénomène. De plus, ce phénomène a été observé via plusieurs paramètres résultants de l'impression (hauteurs de jets, diamètres et volumes) qui étaient plus importants pour la bioencres A à l'ON 0,4: ceci a été constaté en Figure 51, Figure 52 et

Figure 54.

En outre, nous avons observé précédemment (§ 4.2.4 Influence de l'Ouverture Numérique sur  $h_{\text{max}}$ , sur le diamètre et le volume imprimés - Discussion sur l'observation des jets induits par laser et l'impression des bioencres à  $h_{\text{max}}$ ) que plus les

jets et les bases des jets étaient hauts, plus les diamètres et les volumes imprimés étaient importants. Ainsi, nous pouvons interpréter la

Figure 54 avec l'aberration sphérique:

- plus l'ON augmente, plus il y a d'aberration sphérique et plus la fluence au point focal diminue
- la baisse de la fluence entraîne une baisse de la hauteur des jets
- la baisse de la hauteur des jets entraîne la baisse des diamètres et volumes imprimés (car la quantité d'énergie cinétique dans le jet diminue avec l'aberration sphérique et ainsi une plus faible quantité de bioencre est déplacée dans le jet pour être imprimée)

Pour le procédé de bioimpression avec la couche absorbante, il n'y a pas, ou peu, d'aberration sphérique car le faisceau laser ne traverse que la couche de verre du donneur avant sa focalisation, sur la couche absorbante. Dans le cas de la bioimpression sans couche absorbante, l'aberration sphérique est d'autant plus présente que l'épaisseur de bioencre traversée est grande. Ainsi, l'utilisation de la cuve de bioencre dans ce procédé implique la génération d'aberration sphérique, et plus particulièrement lorsque l'épaisseur de la cuve est grande (dans notre cas, quand l'ordre de grandeur de la cuve est 100 fois plus grande que la taille du faisceau focalisé).

## 4.3. Etude de l'influence de la position de focalisation

---

### 4.3.1. Description

#### **Imagerie résolue en temps**

Des expériences d'imageries résolues en temps ont été réalisées pour observer les jets induits par laser lors de la variation de la position du point de focalisation [11]. Les différentes ouvertures numériques ont été étudiées sur la Figure 58, la Figure 59 et la Figure 60, respectivement pour les bioencres A, B et E.

Nous rappelons que la variation de la position de focalisation était de 10  $\mu\text{m}$  entre deux images successives. De plus, la position  $z$  de début d'expérience ( $z$  minimum sur les figures) était réglée de manière à ce que le faisceau soit focalisé bas dans le donneur, puis la position  $z$  était déplacée vers le haut.

Une énergie de 8  $\mu\text{J}$  a été utilisée car cette énergie permet de générer un jet dont la hauteur maximale est toujours comprise dans le champ de la caméra pour toutes nos conditions expérimentales, en particulier pour la condition générant le jet le plus haut de 1400  $\mu\text{m}$  avec la bioencre E et l'ON de 0,4.

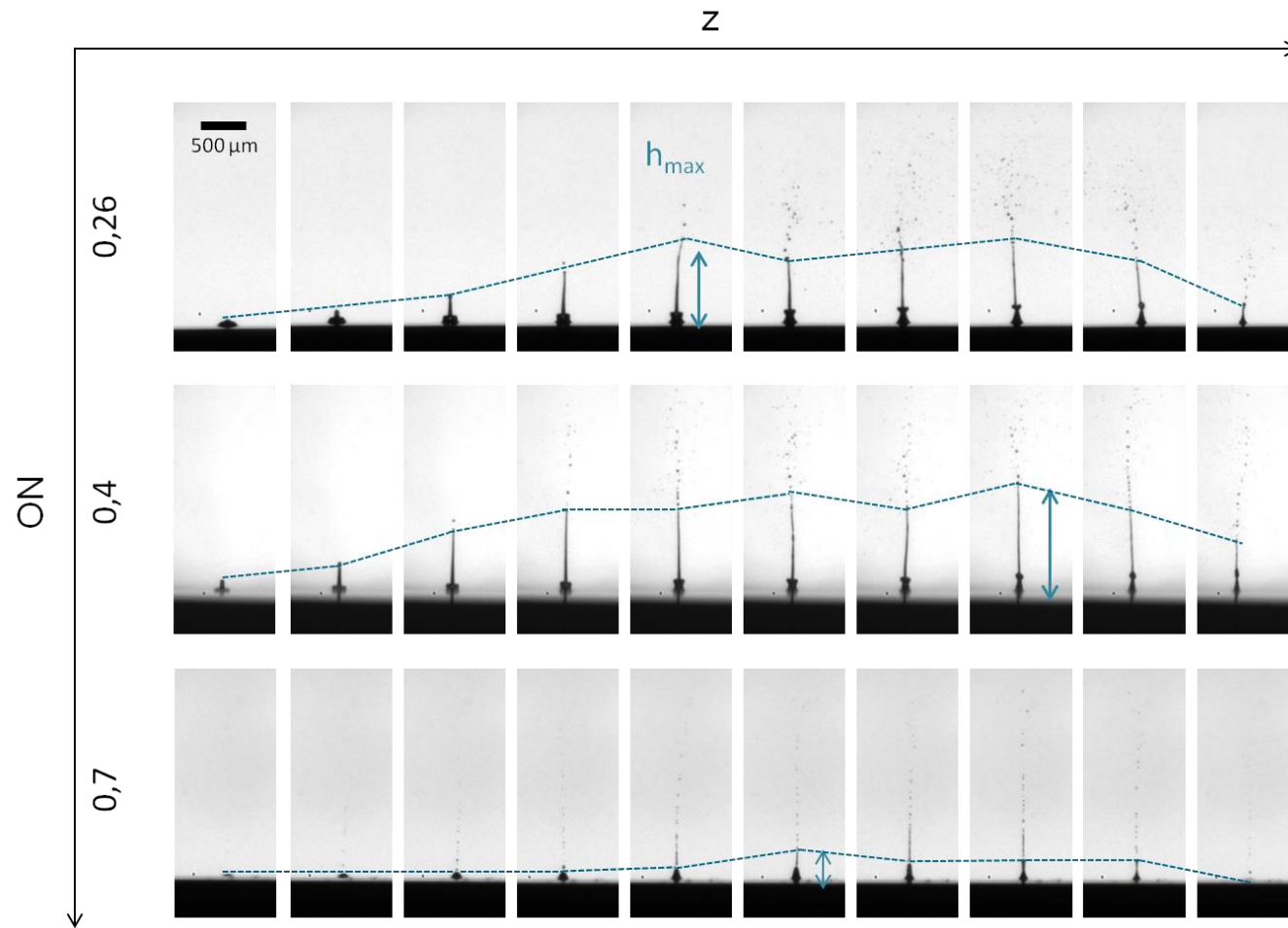


Figure 58 : Images résolues en temps du jet induit par laser lors de la variation de la position de focalisation laser pour la bioencore A et une Ouverture Numérique (ON) de 0,26 à 0,7 (données extraites de [12]). Les images sont prises 30  $\mu\text{s}$  après l'arrivée de l'impulsion laser, à 8  $\mu\text{J}$  et entre 2 images successives la position de l'objectif de focalisation varie de 10  $\mu\text{m}$ .



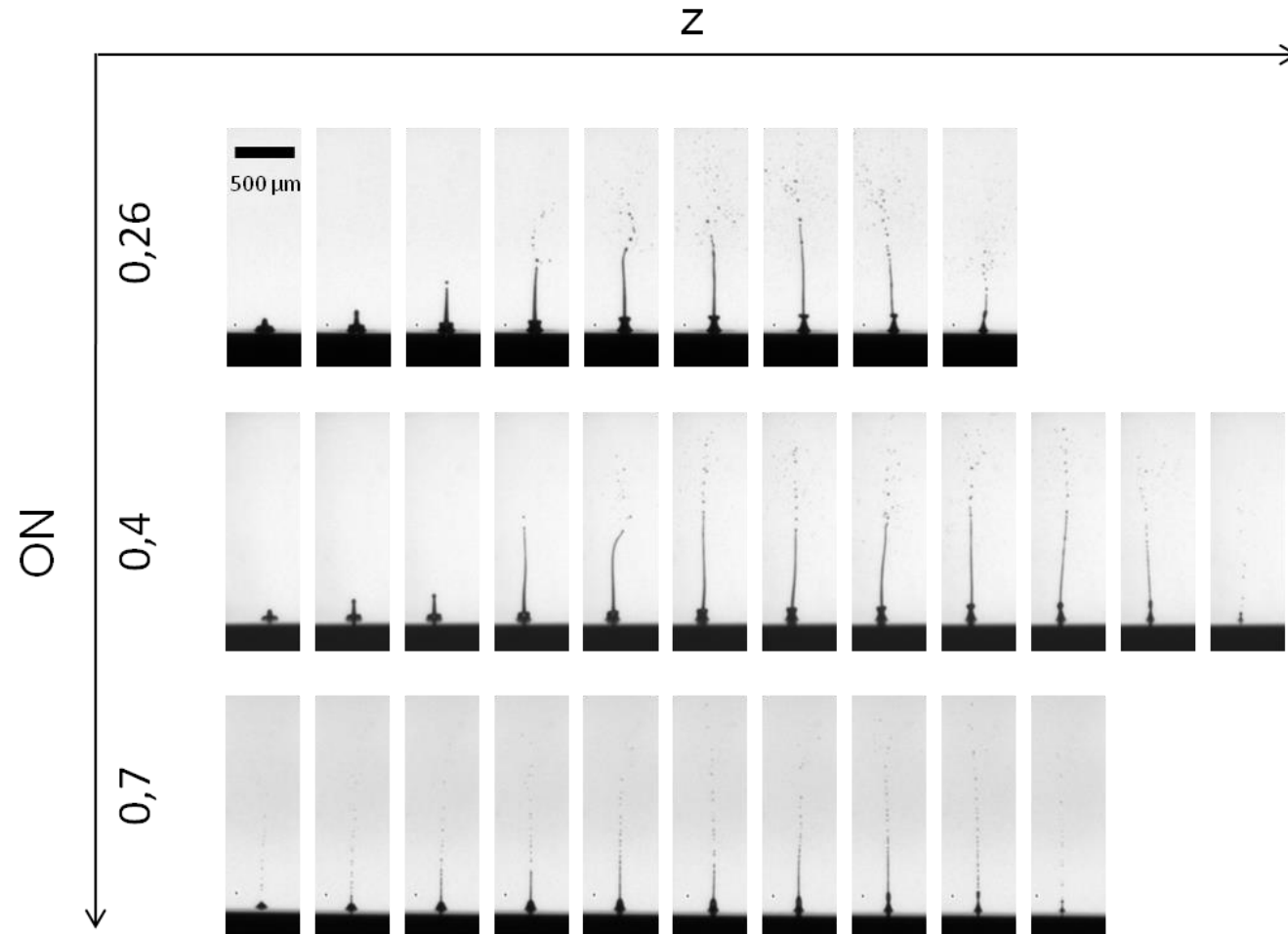


Figure 59 : Images résolues en temps du jet induit par laser lors de la variation de la position de focalisation laser pour la bioencre B et une Ouverture Numérique (ON) de 0,26 à 0,7. Les images sont prises 30  $\mu\text{s}$  après l'arrivée de l'impulsion laser, à 8  $\mu\text{J}$  et entre 2 images successives la position de l'objectif de focalisation varie de 10  $\mu\text{m}$ .

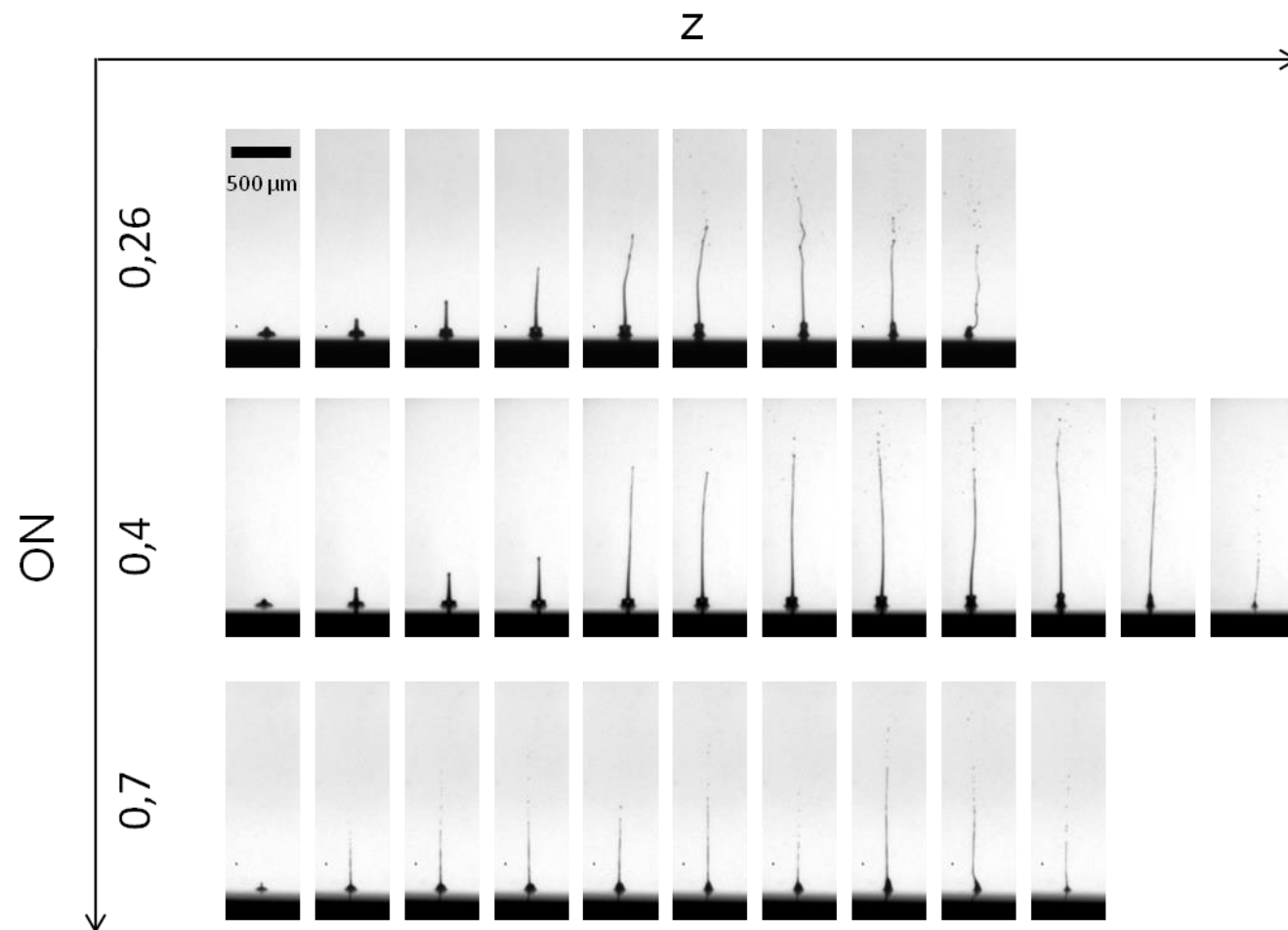


Figure 60 : Images résolues en temps du jet induit par laser lors de la variation de la position de focalisation laser pour la bioencre E et une Ouverture Numérique (ON) de 0,26 à 0,7. Les images sont prises 30  $\mu\text{s}$  après l'arrivée de l'impulsion laser, à 8  $\mu\text{J}$  et entre 2 images successives la position de l'objectif de focalisation varie de 10  $\mu\text{m}$ .

## Hauteur des jets $h$ et variation $\Delta z$

A partir des expériences d'imagerie résolue en temps lors de la variation de la position de focalisation, en Figure 58, Figure 59 et Figure 60, les hauteurs de jets ont été mesurées et reportées sur la Figure 61. La variation de la hauteur du jet a été mesurée, en ne prenant en compte que la partie continue du jet, sans les gouttes se détachant du jet. La partie continue du jet, prise en compte lors des mesures de hauteur de jets, est représentée par la limite en pointillés sur la Figure 58.

La hauteur maximale  $h_{\max}$  pour une condition expérimentale a été relevée et le seuil de hauteur 75%  $h_{\max}$  a été tracé sur la Figure 61. Nous rappelons que nous avons identifié ce seuil comme un seuil de reproductibilité de notre procédé (§ 4.2.3 Influence de la distance d'impression et de l'Ouverture Numérique sur les diamètres et volumes imprimés).

Les données de la Figure 62 sont extraites de la Figure 61 : elles représentent la variation de la position  $z$  de focalisation possible pour rester dans les conditions de reproductibilité du procédé, *i.e.* être supérieur au seuil de hauteur de 75%  $h_{\max}$ .

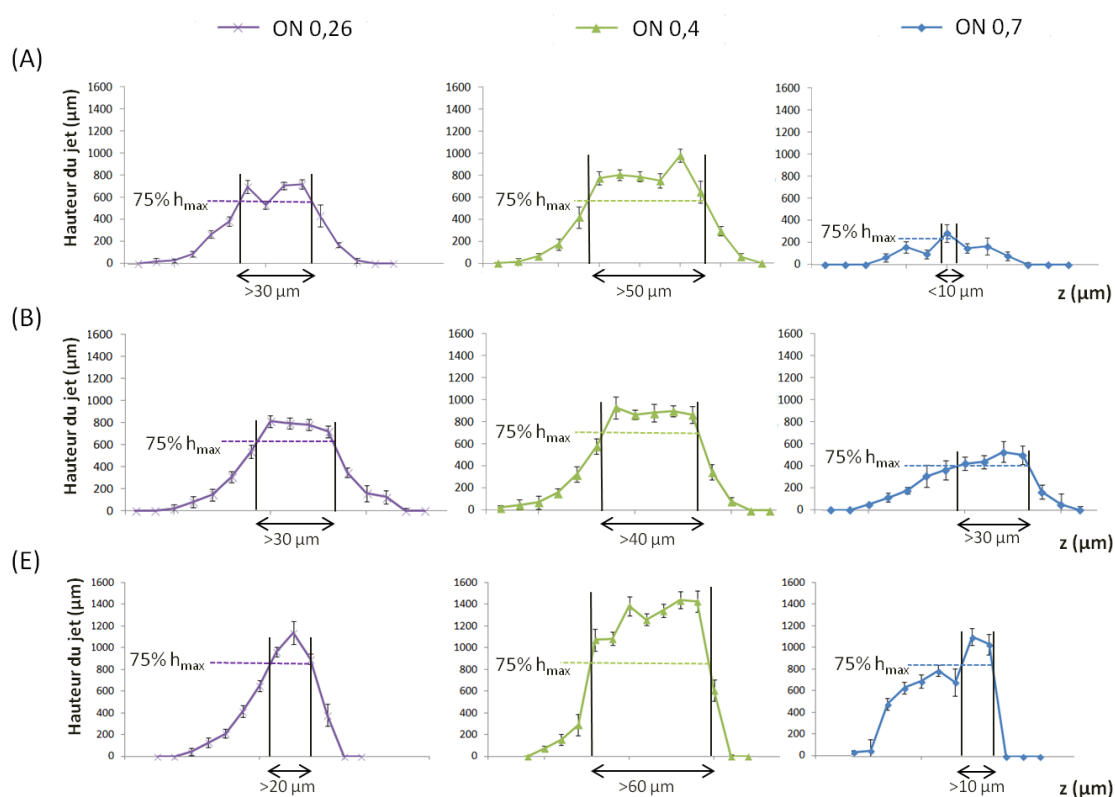


Figure 61 : Influence expérimentale de la position de focalisation laser longitudinale pour les bioencres A, B et E. Les hauteurs de jet sont mesurées 30  $\mu\text{s}$  après l'arrivée de l'impulsion laser pour une énergie de 8  $\mu\text{J}$ .

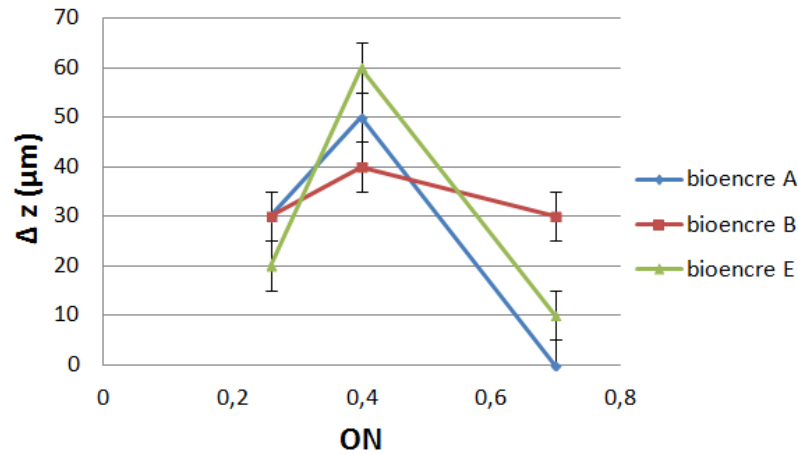


Figure 62 : Tolérance sur la position de l'objectif de microscope pour obtenir un jet de hauteur minimale de 75%  $h_{\max}$  pour les bioencres A, B, E et une Ouverture Numérique variant de 0,26 à 0,7.

### 4.3.2. Résultats expérimentaux

#### Imagerie résolue en temps

Sur la Figure 58, la Figure 59 et la Figure 60, nous observons le jet croître puis décroître lorsque  $z$  augmente pour toutes les bioencres. De plus, la hauteur du jet est moindre à l'ON 0,7, comparée aux autres ON pour toutes les bioencres.

Visuellement, la baisse de la hauteur de jet semble s'effectuer brutalement pour des  $z$  élevés (en peu d'images) alors que la montée de la hauteur de jet semble plus progressive pour des  $z$  bas.

Les jets sont souvent non perpendiculaires au donneur. Aussi, les jets des ON 0,7 se rompent en un nombre important de gouttes pour les bioencres A et B.

#### Hauteur des jets $h$ et variation $\Delta z$

Premièrement, nous pouvons voir que la hauteur du jet est maximale pour l'ON 0,4 pour toutes les bioencres, même si la différence entre la hauteur maximale de jet  $h_{\max}$  pour la bioencres B et les ON 0,26 et 0,4 est faible : elle est respectivement de 813  $\mu\text{m}$  et de 933  $\mu\text{m}$ .

Deuxièmement, d'après la Figure 62, les plus grandes variations  $\Delta z$  correspondant à des jets supérieurs à 75%  $h_{\max}$  (seuil de reproductibilité), sont trouvés pour l'ON 0,4 avec des variations  $\Delta z$  de 40 à 60  $\mu\text{m}$  selon la bioencres. Les plus petites

variations  $\Delta z$  sont obtenues pour l'ON 0,7 avec des variations  $\Delta z$  de 10  $\mu\text{m}$  à 30  $\mu\text{m}$ . Cette variation  $\Delta z$  peut être vue comme une profondeur de champ équivalente.

### 4.3.3. Discussion

#### **Imagerie résolue en temps**

La variation de la hauteur du jet lorsque  $z$  varie indique qu'il existe une position  $z$  optimale de façon à obtenir un jet de hauteur maximale et ceci avec une précision sur la position d'au moins 10  $\mu\text{m}$  près.

De plus, les jets non perpendiculaires au donneur doivent être dus à la répétition rapide des expériences de façon à éviter l'évaporation de la bioencre pendant le déplacement de la position de focalisation : comme vu précédemment (§ 4.2.4 Influence de l'Ouverture Numérique sur  $h_{\text{max}}$ , sur le diamètre et le volume imprimés ; Discussion sur l'observation des jets induits par laser et l'impression des bioencres à  $h_{\text{max}}$  ; Jets sur receveur à  $h_{\text{max}}$ ), l'interaction entre deux bulles de cavitation rapprochées peut mener à la formation de jets déviés et non perpendiculaires au donneur. Une autre explication avancée aussi précédemment est la transmission de vibration au donneur entraînant une perturbation de la surface de la bioencre, qui est responsable des jets déviés.

#### **Hauteur des jets $h$ et variation $\Delta z$**

La profondeur de champ équivalente donnée par  $\Delta z$  sur la Figure 62 est beaucoup plus élevée que la profondeur de champ rappelée dans le Tableau 4-7 (4  $\mu\text{m}$  dans l'air) prévue pour un système sans aberration à l'ON 0,4.

Nous avons constaté que cette profondeur de champ équivalente est principalement due à l'aberration sphérique longitudinale. En effet, pour l'ON 0,4, la simulation optique du système, illustrée par la Figure 63, nous donne une valeur de  $0,43 \times \lambda$  pour le polynôme  $Z_9$  de Zernike (cf. Annexe E ; nous rappelons que l'aberration sphérique est classiquement donnée par  $Z_9 = \lambda \times (6r^4 - 6r^2 + 1)$ , où  $r$  est le rayon normalisé de la pupille du système). La valeur  $l$  de la caustique longitudinale d'aberration sphérique, représentée Figure 64, peut être liée au front d'onde aberrant grâce à  $Z_9$  par la relation (cf. Annexe E) :

$$\frac{l \times ON^2}{4} = \frac{6 \times Z9}{n} \quad (4.3.3.1)$$

Où  $n$  est l'indice optique du milieu

ON est l'ouverture numérique

Z9 est le polynôme de Zernike pour l'aberration sphérique

Pour l'ON 0,4,  $n=1,33$  ( $n=1,33$  pour la bioencore A et  $n$  peut être approximé par 1,33 pour les bioencres B et E comme elles contiennent 90% (v/v) d'eau d'indice  $n=1,33$  avec 10 % (v/v) de glycérol d'indice  $n=1,47$ ),  $\lambda=1,03 \mu\text{m}$  et  $Z9 = 0,43 \times \lambda$ , nous constatons que  $l = 50 \mu\text{m}$ , ce qui est en accord avec la gamme longitudinale  $z$  observée Figure 62 . De la même manière pour l'ON 0,26, nous trouvons  $l = 23 \mu\text{m}$  ( $Z9 = 0,08 \times \lambda$  dans ce cas) une valeur qui correspond également bien aux résultats de la Figure 61. Il est plus difficile de trouver une bonne correspondance entre les calculs et les résultats expérimentaux pour l'ON 0,7 où le calcul de  $l$  donne  $130 \mu\text{m}$  (contre de 0 à  $30 \mu\text{m}$  sur la Figure 62). En effet, nous avons observé que, dans le cas de hautes ON comme l'ON 0,7, la fluence incidente était réduite en raison de l'étalement du faisceau.

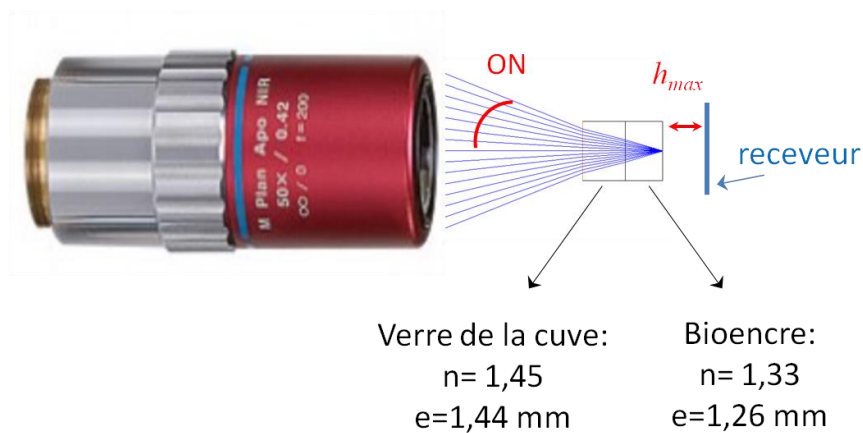


Figure 63 : Zoom de la propagation finale du faisceau à l'ON 0,4 illustrant l'aberration sphérique.

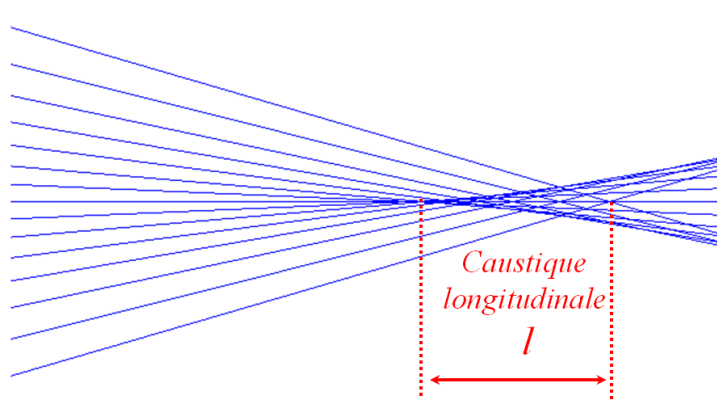


Figure 64 : Illustration de la caustique longitudinale ou profondeur de champs équivalente due à l'aberration sphérique.

Le but principal de l'étude de l'effet de la variation de la position de focalisation sur le jet, était de savoir si imprimer avec des  $z$  différents et la même distance d'impression était possible (et dans quelle mesure de  $z$  et de distance d'impression). La variation de la distance d'impression pour avoir un procédé reproductible a été identifiée précédemment (§ 4.2.3 Influence de la distance d'impression et de l'Ouverture Numérique sur les diamètres et volumes imprimés) et a été établie à 25%  $h_{\max}$  (hauteur maximale – hauteur minimale =  $h_{\max} - 75\% h_{\max} = 25\% h_{\max}$ ). La variation de la position de focalisation  $\Delta z$  reste au final restreinte : de 0 à 60  $\mu\text{m}$  selon les conditions. D'après la Figure 61 et la Figure 62, l'ON 0,4 présente les valeurs les plus élevées  $\Delta z$  et paraît ainsi la plus adaptée à l'intégration dans une machine de bioimpression industrielle plus tolérante.

## 4.4. Conclusion

---

### 4.4.1. Discussion générale

#### **Procédé de bioimpression sans couche absorbante**

Dans le but de développer la bioimpression par laser pour des applications biologiques, les conditions d'impression qui permettraient une survie cellulaire de 100 % ont été recherchées. La maximisation de la survie cellulaire correspond à une vitesse minimale du jet lors de l'impact d'impression. Cette vitesse minimale du jet a bien été observée à  $T(h_{\max})$  ou à  $T(h_{\max}) + 10 \mu s$ . Ainsi, nous recherchions la hauteur maximale du jet  $h_{\max}$  pour le procédé de bioimpression afin de maximiser la survie cellulaire.

Par la suite, nous cherchions à maximiser la tolérance sur la position du substrat receveur de façon à paramétrer un procédé de bioimpression plus facile à régler et mettre en place pour l'opérateur. Un seuil de distance d'impression permettant d'obtenir des diamètres et volumes imprimés reproductibles a été trouvé : il était de 75%  $h_{\max}$ . Le seuil de 75%  $h_{\max}$  définissant la tolérance sur la position du substrat receveur, il fallait maximiser ce seuil.

Ainsi, nous cherchions à obtenir le plus grand  $h_{\max}$  possible pour maximiser la tolérance sur la position du substrat receveur. C'est pour cette raison que maximiser  $h_{\max}$  fut notre critère afin de déterminer l'ON optimale pour la bioimpression sans couche absorbante.

Finalement, l'ON 0,4 permettait d'obtenir le plus grand  $h_{\max}$  pour toutes les bioencres. De cette manière, parmi les ON testées, elle semble être un optimum pour le procédé de bioimpression sans couche absorbante.

Par ailleurs, la tolérance sur la position de focalisation  $\Delta z$  a été mesurée au seuil de distance d'impression de 75%  $h_{\max}$ . La tolérance était maximale à l'ON optimum 0,4 (de 40  $\mu m$  à 60  $\mu m$ ), mais très faible comparée à la tolérance sur la position du substrat receveur.



## Ouverture numérique et aberration sphérique

Pour le procédé de bioimpression avec la couche absorbante, il n'y a pas d'aberration sphérique car le faisceau laser ne traverse que la couche de verre du donneur avant sa focalisation, sur la couche absorbante.

En revanche, dans le cas de la bioimpression sans couche absorbante, l'aberration sphérique est d'autant plus présente que l'ouverture numérique est importante et que l'épaisseur de bioencres traversée est grande. Ainsi, l'utilisation de la cuve de bioencres dans ce procédé implique la génération de l'aberration sphérique, et plus particulièrement lorsque l'épaisseur de la cuve est grande (dans notre cas, quand l'ordre de grandeur de la cuve est 100 fois plus grande que la taille du faisceau focalisé).

Cependant, la présence de l'aberration sphérique n'explique pas tous nos résultats, lors de la variation de l'ON. En effet, deux résultats restent incompris :

- l'observation de paramètres résultants de l'impression (hauteurs de jets, diamètres et volumes) plus importants pour la bioencres A à l'ON 0,4
- l'observation de hauteurs de jets plus importantes à l'ON 0,4 et pour toutes les bioencres, lors de la variation de la position de focalisation

Une modélisation de la bioencres A, afin de calculer les aberrations réelles générées, ainsi qu'une mesure des aberrations lors des expériences seraient intéressantes afin de comprendre comment le faisceau se propage dans les bioencres.

### 4.4.2. En résumé

Premièrement, nous avons caractérisé les bioencres pour la bioimpression avec une couche absorbante d'or : les spectres d'absorbances, les viscosités et les tensions de surface ont été mesurées. Nous notons que les spectres d'absorbances de toutes les bioencres ne présentent pas de pic d'intensité pour la longueur d'onde laser. L'absorbance de la bioencres ne peut donc être tenue comme principal facteur de transfert de l'énergie à la bioencres lors de la bioimpression. De plus, les viscosités et tensions de surfaces des bioencres A, B et E s'étendaient respectivement de 1,28 mPa.s à 19 mPa.s et de 34,4 mN/m à 73,5 mN/m.

Deuxièmement, plusieurs paramètres de la bioimpression sans couche absorbante ont été étudiés :

- les hauteurs de jet maximales  $h_{max}$  atteintes au cours du temps (des hauteurs de 240  $\mu\text{m}$  à 2100  $\mu\text{m}$  pour des temps allant de 1  $\mu\text{s}$  à 220  $\mu\text{s}$ ) et lorsque l'objectif de focalisation est déplacé dans la direction de propagation du laser (jusqu'à 180  $\mu\text{m}$ )
- les temps de hauteurs maximales du jet T ( $h_{max}$ ) (de 8  $\mu\text{s}$  à 120  $\mu\text{s}$ )
- des vitesses et accélérations instantanées (de 0 m/s à 68 m/s et de 3.104 m/s<sup>2</sup> à 4,1.107 m/s<sup>2</sup>)
- les volumes et diamètres imprimés (de 46  $\mu\text{m}$  à 329  $\mu\text{m}$  et de 38 pL à 1597 pL) à des distances d'impression de 50 %  $h_{max}$  à  $h_{max}$  (de 240  $\mu\text{m}$  à 2090  $\mu\text{m}$ )
- des objectifs de focalisation d'ON de 0,26 0,4 et 0,7
- des profondeurs de champs équivalentes pour les 3 ON et bioencres (de 20  $\mu\text{m}$  à 30  $\mu\text{m}$  pour l'ON 0,26 ; de 40  $\mu\text{m}$  à 60  $\mu\text{m}$  pour l'ON 0,4 ; de 0  $\mu\text{m}$  à 30  $\mu\text{m}$  pour l'ON 0,7)

En outre, l'effet de la viscosité des bioencres a été étudié. Une forte viscosité (19 mPa.s par rapport à 1,5 mPa.s) résulte en :

- des hauteurs de jet plus importantes, y compris les hauteurs de jet maximales  $h_{max}$  (effet négligeable de la tension de surface sur la hauteur de jet, trop faibles variations)
- des temps de hauteurs maximales du jet, T ( $h_{max}$ ) plus grands
- des jets plus fins donc des volumes et diamètres imprimés moindres

Par ailleurs, l'effet de l'ON a été étudié. L'aberration sphérique dans le chemin optique peut expliquer l'effet de l'ON. De plus, la diminution de  $h_{max}$  avec l'augmentation de l'ON peut être attribuée à la diminution de la fluence. En effet, avec la présence d'aberration sphérique, lorsque l'ON augmente à une énergie d'impulsion constante, le diamètre au point de focalisation augmente et résulte en la diminution de la fluence. Le phénomène peut être décrit comme suit :

- la baisse de la fluence entraîne une baisse de la hauteur des jets
- la baisse de la hauteur des jets entraîne la baisse des diamètres et volumes imprimés (car la quantité d'énergie cinétique dans le jet diminue avec l'aberration sphérique et ainsi une plus faible quantité de bioencre est déplacée dans le jet pour être imprimée)

Les rayons au point de focalisation calculés par les simulations Zemax étaient de 7  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$  et 43  $\mu\text{m}$ , respectivement pour les ON 0,26 0,4 et 0,7. Le critère utilisé pour définir les rayons au point de focalisation correspond aux 84% d'intensité lumineuse diffractée contenus dans l'anneau central de la tâche d'Airy.

De plus, une importante ON (0,7 par rapport à 0,4 ou 0,26) résulte en :

- T (hmax) plus petit
- hmax plus petit (sauf pour l'ON 0,4)
- des jets plus rapides et avec une plus grande accélération, avec une oscillation de la vitesse et de l'accélération dans le temps qui est bien supérieure aux ON 0,26 et 0,4
- des diamètres et volumes similaires mesurés pour les trois bioencres
- des diamètres et volumes imprimés qui diminuent globalement
- une hauteur du jet moindre quand z varie comparée aux autres ON pour toutes les bioencres
- une plus forte aberration sphérique et une plus petite fluence au point focal

De plus, un seuil de reproductibilité a été établi pour  $h > 75\% h_{\text{max}}$ . En effet, si la distance d'impression  $d_{\text{impression}} \geq 75\% h_{\text{max}}$ , et donc si  $d_{\text{impression}}$  subit une variation de 25 %, les diamètres et volumes imprimés varient peu : au maximum 17 % pour les diamètres et 21 % pour les volumes.

Les plus grandes variations  $\Delta z$  correspondant à des jets supérieurs au seuil de reproductibilité, sont trouvés pour l'ON 0,4 avec des variations  $\Delta z$  de 40 à 60  $\mu\text{m}$  selon la bioencre. Les plus petites variations  $\Delta z$  sont obtenues pour l'ON 0,7 avec des variations  $\Delta z$  de 10  $\mu\text{m}$  à 30  $\mu\text{m}$ . Cette variation  $\Delta z$ , qui peut être vue comme une profondeur de champ équivalente, reste faible pour l'ensemble des ON. Cette profondeur de champs équivalente  $\Delta z$  est principalement due à l'aberration sphérique longitudinale (par le calcul avec le polynôme Z9 de Zernike nous trouvons des profondeurs de champ de l'ordre de grandeur de celles trouvées expérimentalement pour les ON 0,26 et 0,4, respectivement 23  $\mu\text{m}$  et 50  $\mu\text{m}$  ; la valeur pour l'ON 0,7 est bien supérieure à celle observée avec 130  $\mu\text{m}$ ).

Ainsi, pour bioimprimer sans couche absorbante, la tolérance est faible (de l'ordre de la dizaine de microns) sur la position de l'optique de focalisation mais la position du receveur peut varier de 25%  $h_{\text{max}}$ .

1. D. Young, R. C. Y. Auyeung, A. Piqué, D. B. Chrisey, and D. D. Dlott, "Plume and jetting regimes in a laser based forward transfer process as observed by time-resolved optical microscopy," *Appl. Surf. Sci.* **197-198**, 181–187 (2002).
2. A. Souquet, *Etude Des Processus Physiques Mis En Jeu Lors de La Microimpression D'éléments Biologiques Assistée Par Laser* (Bordeaux 1, 2011).
3. C. Mézel, A. Souquet, J. Breil, D. Hébert, and F. Guillemot, "Self-consistent modeling of jet formation process in the nanosecond laser pulse regime," *Phys. Plasmas* **16**, 123112 (2009).
4. F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, J. Lopez, M. Faucon, B. Pippenger, R. Bareille, M. Rémy, S. Bellance, P. Chabassier, J. C. Fricain, and J. Amédée, "High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering," *Acta Biomater.* **6**, 2494–2500 (2010).
5. A. Pearson, E. Cox, J. R. Blake, and S. R. Otto, "Bubble interactions near a free surface," *Eng. Anal. Bound. Elem.* **28**, 295–313 (2004).
6. A. Patrascioiu, J. M. Fernández-Pradas, J. L. Morenza, and P. Serra, "Film-free laser printing: jetting dynamics analyzed through time-resolved imaging," *Appl. Surf. Sci.* **302**, 303–308 (2013).
7. N. Takizawa, K. Okano, T. Uwada, Y. Hosokawa, and H. Masuhara, "Viability evaluation of culture cells patterned by femtosecond laser-induced impulsive force," in S. L. Jacques, W. P. Roach, and R. J. Thomas, eds. (2008), pp. 685411–685411–6.
8. V. Dinca, A. Ranella, M. Farsari, D. Kafetzopoulos, M. Dinescu, A. Popescu, and C. Fotakis, "Quantification of the activity of biomolecules in microarrays obtained by direct laser transfer," *Biomed. Microdevices* **10**, 719–25 (2008).
9. W. Wang, Y. Huang, M. Grujicic, and D. B. Chrisey, "Study of Impact-Induced Mechanical Effects in Cell Direct Writing Using Smooth Particle Hydrodynamic Method," *J. Manuf. Sci. Eng.* **130**, 021012–10 (2008).
10. Muhammad Ali, "Etude d'un nouveau dispositif de bioimpression par laser," UNIVERSITÉ BORDEAUX 1 (2014).
11. H. Desrus, B. Chassagne, F. Moizan, R. Devillard, S. Petit, R. Kling, and S. Catros, "Effective parameters for film-free femtosecond laser assisted bioprinting - under review," *Appl. Opt.* (2016).
12. H. Desrus, B. Chassagne, S. Catros, C. Artiges, R. Devillard, S. Petit, F. Deloison, J. C. Fricain, F. Guillemot, and R. Kling, "Laser assisted bioprinting using a femtosecond laser and a gold transductive layer: a parametric study," in (E. Duco Jansen, 2016), Vol. Optical Interactions with Tissue and Cells XXVII, PR 9706.
13. M. Duocastella, J. M. Fernández-Pradas, J. L. Morenza, and P. Serra, "Time-resolved imaging of the laser forward transfer of liquids," *J. Appl. Phys.* **106**, 084907 (2009).
14. Z. Zhang, R. Xiong, R. Mei, Y. Huang, and D. B. Chrisey, "Time-Resolved Imaging Study of Jetting Dynamics during Laser Printing of Viscoelastic Alginate Solutions," *Langmuir* **31**, 6447–6456 (2015).
15. C. Unger, M. Gruene, L. Koch, J. Koch, and B. N. Chichkov, "Time-resolved imaging of hydrogel printing via laser-induced forward transfer," *Appl. Phys. A* (2010).
16. L. Rayleigh, "On the capillary phenomena of jets," *Proc. R. Soc. London* **29**, 71–97 (1879).
17. A. CASNER, "Déformations, manipulations et instabilités d'interfaces liquides induites par la pression de radiation d'une onde laser.," *Fluid Dynamics, Université Sciences et Technologies, Bordeaux I* (2002).
18. M. S. Brown, "Experimental and Numerical Study of Laser-Induced Forward Transfer Printing of Liquids," PRINCETON UNIVERSITY (2011).
19. P. Serra, A. Patrascioiu, A. Palla-Papavlu, J.M. Fernández-Pradas, and J.L. Morenza, "LASER MICROPRINTING OF TRANSPARENT AND WEAKLY ABSORBING SOLUTIONS," (n.d.).

20. C. Boutopoulos, M. Chatzipetrou, A. G. Papathanasiou, and I. Zergioti, "Time-resolved imaging and immobilization study of biomaterials on hydrophobic and superhydrophobic surfaces by means of laser-induced forward transfer," *Laser Phys. Lett.* **11**, 105603 (2014).
21. J. Eggers, "Nonlinear dynamics and breakup of free-surface flows," *Reviews of modern physics* **69**, 865 (1997).
22. M. Ali, E. Pages, A. Ducom, A. Fontaine, and F. Guillemot, "Controlling laser-induced jet formation for bioprinting mesenchymal stem cells with high viability and high resolution," *Biofabrication* **6**, 045001 (2014).
23. W. Wang, G. Li, and Y. Huang, "Modeling of Bubble Expansion-Induced Cell Mechanical Profile in Laser-Assisted Cell Direct Writing," *J. Manuf. Sci. Eng.* **131**, 051013 (2009).
24. B. Hopp, T. Smausz, N. Kresz, N. Barna, Z. Bor, L. Kolozsvári, D. B. Chrisey, A. Szabó, and A. Nógrádi, "Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer," *Tissue Eng.* **11**, 1817–23 (2005).
25. C. F. Brasz, J. H. Yang, and C. B. Arnold, "Tilting of adjacent laser-induced liquid jets," *Microfluid. Nanofluidics* **18**, 185–197 (2015).
26. E. Biver, L. Rapp, A.-P. Alloncle, and P. Delaporte, "Multi-jets formation using laser forward transfer," *Appl. Surf. Sci.* **302**, 153–158 (2014).
27. L. Duchemin, "Self-focusing of thin liquid jets," *Proc. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **464**, 197–206 (2008).

## 5. Conclusion et perspectives

## Conclusion

Les lasers femtosecondes constituent un outil prometteur pour la bioimpression d'éléments biologiques : la versatilité des matériaux qui peuvent être déposés et la zone affectée thermiquement négligeable lors de leur utilisation pour cette application en font des solutions de choix pour l'impression de structures biologiques complexes, sans compromettre la viabilité et la fonctionnalité des matériaux biologiques transférés. Dans ce contexte, l'objectif général de la thèse était d'étudier les mécanismes physiques de deux procédés de bioimpression par laser femtoseconde, le premier impliquant une couche absorbante métallique, et le second sans couche absorbante. Le premier procédé, historique dans le domaine de la bioimpression, avait largement été utilisé dans des travaux antérieurs dans des montages expérimentaux différents du nôtre. Le second procédé constitue une voie alternative d'amélioration, en s'affranchissant d'une couche absorbante : ceci permet de gagner du temps et de l'argent (évaporateur à or ou titane) et d'éviter la contamination du substrat receveur par des particules métalliques provenant de cette couche absorbante : ces particules pourraient altérer la viabilité et la fonctionnalité biologique des structures imprimées.

Dans un premier temps, la bioimpression par laser femtoseconde avec couche absorbante a été étudiée sur une bioimprimante permettant de travailler dans un environnement contrôlé (condition de températures, d'humidité) et dans des conditions stériles pour l'impression cellulaire. Une étude expérimentale a été menée par observation du jet induit par laser grâce à un système d'imagerie résolue en temps (TRI) et par impression sur receveur (puits de culture). Des bioencres de viscosités allant de 1,3 mPa.s à 146 mPa.s ainsi qu'une bioencre de cellules kératinocytes ont été imprimées et ont permis de déterminer une plage d'énergies d'impression de 2  $\mu\text{J}$  à 3,5  $\mu\text{J}$ . Des tests de viabilité cellulaire après l'impression ont permis d'identifier une énergie optimale de 3  $\mu\text{J}$ . L'étude de la variation de la position de focalisation a permis de prédire la plage de tolérance de la position de focalisation du laser : pour une énergie de 3,5  $\mu\text{J}$  et une ON équivalente de 0,125, la tolérance maximale dans la direction « z » était de 60  $\mu\text{m}$  pour pouvoir imprimer.

Dans un second temps, la bioimpression par laser femtoseconde sans couche absorbante a été étudiée sur un montage expérimental comprenant une cuve qui contenait la bioencre. Une étude expérimentale a été menée par observation du jet induit par laser grâce à un système d'imagerie résolue en temps (TRI) et par impression sur receveur (lames de verre). Des bioencres de viscosités allant de 1,3 mPa.s à 19 mPa.s ont été imprimées. De plus, une étude de l'influence de l'ouverture numérique ON de

l'objectif de focalisation, en faisant varier la composition de la bioencres, a été menée sur plusieurs paramètres :

- la hauteur de jet, la hauteur de jet maximale  $h_{\max}$ , ainsi que le temps nécessaire pour arriver à  $h_{\max}$
- la vitesse et l'accélération du jet
- le diamètre et le volume imprimés en fonction de la distance d'impression, où la distance d'impression était définie en fonction d'un pourcentage de  $h_{\max}$
- la position de focalisation  $z$  dans l'épaisseur de la bioencres et la tolérance de focalisation  $\Delta z$ , dont l'effet était analysé via la hauteur de jet et  $h_{\max}$

En outre, certains effets de l'ON ont été expliqués par l'évaluation de l'aberration sphérique entachant le faisceau sur le chemin optique qui traversait la cuve de bioencres. En particulier, l'évaluation de l'aberration sphérique du système était cohérente pour décrire la baisse de  $h_{\max}$  lors de l'augmentation de l'ON. Cependant, cette évaluation n'expliquait pas pourquoi l'ON optimale générant les jets les plus hauts était de 0,4 et non de 0,26.

Au final, une plage de reproductibilité a été identifiée pour une distance d'impression de 75 %  $h_{\max}$  à 100 %  $h_{\max}$ . Par ailleurs, une ON optimale a été déterminée à l'ON 0,4. Cette ON générait les jets les plus hauts et donc permettant d'avoir une plage de reproductibilité plus grande pour la distance d'impression. De plus, une tolérance de focalisation  $\Delta z$  a été mesurée, notamment à l'ON 0,4: elle était de 0 à 60  $\mu\text{m}$  selon la bioencres. Cette tolérance est faible au regard de la tolérance sur la position du receveur qui peut subir une variation de 25%  $h_{\max}$ , d'après la plage de reproductibilité.



## Perspectives

Parmi les différentes pistes de recherche ouvertes à l'issue de cette étude, nous pouvons discerner d'une part des perspectives expérimentales et d'autre part des perspectives de modélisation.

Pour la partie expérimentale, une étude de l'influence de l'angle de déviation du laser, par rapport au donneur, serait intéressante afin de savoir s'il existe une tolérance de perpendicularité du faisceau laser par rapport au donneur. Ceci permettrait de savoir avec quelle précision il est nécessaire de régler la normalité du faisceau par rapport au donneur pour un montage de bioimpression ou une bioimprimante industrielle.

Aussi, l'étude de l'influence de la qualité du faisceau sur l'impression (écart du faisceau par rapport à un faisceau gaussien, faisceau elliptique) serait une étude possible pour déterminer les besoins d'un montage de bioimpression ou d'une bioimprimante industrielle en termes de qualité de faisceau.

De plus, l'étude de l'influence d'une mise en forme de faisceau sur la bioimpression pourrait, d'une part, permettre d'améliorer l'efficacité du transfert énergétique du laser à la bioencres (par exemple avec un faisceau top-hat), d'autre part, permettre d'améliorer la rapidité de la bioimpression de larges structures (par exemple avec un faisceau divisé en plusieurs spots, grâce à des optiques diffractives ou grâce à des microsystèmes électromécaniques de type MEMS). Dans le second cas, les impulsions ne devraient pas être trop proches spatialement et/ou temporellement [1] (des jets non perturbés ont été obtenus pour des distances inter-impulsions de 25  $\mu\text{m}$  à un taux de répétition de 500 kHz et une vitesse scanner de 12,5 m/s, soit une génération de 500 000 jets/seconde non perturbés).

Par ailleurs, l'utilisation d'un train de plusieurs impulsions laser (appelé « mode burst » laser), testé brièvement pendant cette thèse avec la bioimpression sans couche absorbante (cf. Figure 65), pourrait être une piste à explorer, menant à de nouveaux procédés de bioimpression. La durée entre deux impulsions successives, le nombre d'impulsions, le nombre de trains d'impulsions, ou encore l'énergie de chaque impulsion pourraient être des paramètres à analyser. Il faudrait veiller à ce que les impulsions ne soient pas trop rapprochées temporellement et/ou spatialement, pour éviter une déviation du jet généré [2] (pour limiter au mieux les déviations de jets, avec un délai temporel d'environ 100  $\mu\text{s}$  entre les impulsions, les impulsions devraient être au moins espacées de plus de 120  $\mu\text{m}$  pour une énergie de 6  $\mu\text{J}$  et au moins de 175  $\mu\text{m}$  pour une énergie de 7,5  $\mu\text{J}$ ).

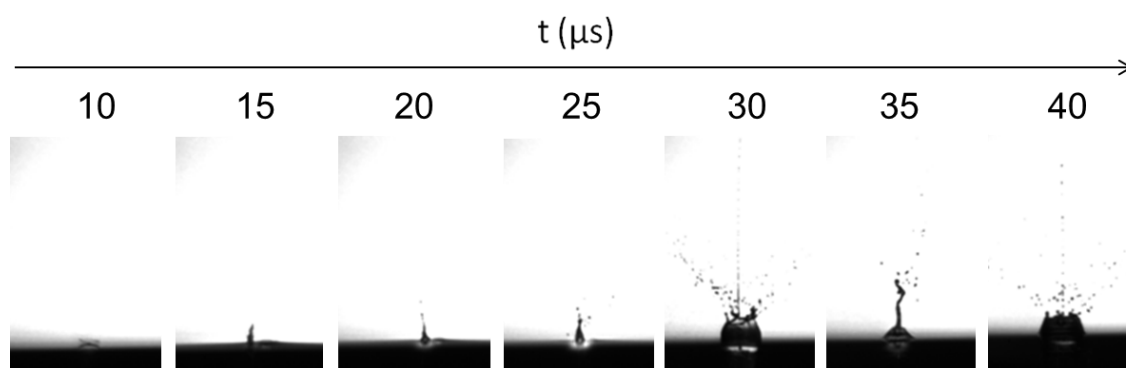


Figure 65 : Jet d'un train de 2 impulsions laser (appelé « mode burst » laser). Conditions expérimentales : bioencre A ; 30  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de bioencre ; 6  $\mu\text{J}$  ; 1,4 ps de durée d'impulsion ; 200 kHz.

Qui plus est, il faudra réaliser des impressions de cellules avec un montage expérimental de bioimpression sans couche absorbante et tester leur viabilité en utilisant une bioimprimante incluant un scanner et un laser suffisamment énergétique. Différents tests pourraient être réalisés pour qualifier de manière plus précise la viabilité, avec des tests Live/dead et des tests de prolifération et de différenciation cellulaires après impression. De plus, ces tests pourraient être réalisés à différents temps après l'impression. Ceci permettrait d'évaluer l'intérêt d'utiliser un montage expérimental avec un laser femtoseconde sans couche absorbante, en comparant ces résultats avec ceux obtenus précédemment dans l'équipe dans le cas d'un montage expérimental de bioimpression par laser avec couche absorbante. Aussi, une étude de la viabilité cellulaire identique devra être réalisée pour la bioimpression par laser femtoseconde avec couche absorbante, de façon à comparer l'influence de la couche absorbante sur la viabilité.

Aussi, afin de vasculariser pour assurer la viabilité de long terme de tissus cellulaires épais imprimés (épaisseur  $> 300 \mu\text{m}$ ), il serait intéressant de micro-usiner des capillaires par laser femtoseconde dans des biomatériaux. Les capillaires, de taille micrométrique, assureraient le transport de nutriments et l'évacuation des déchets pour les cellules imprimées. Celles-ci ne devraient pas se retrouver à moins de  $200 \mu\text{m}$  de ces capillaires de façon à pouvoir capter les nutriments des capillaires. Des expériences préliminaires (*cf.* Figure 66), réalisées dans des gels de PVA (à Alphanov par Florent Deloison), ont montré qu'il était possible de générer des canaux en focalisant un laser femtoseconde dans la profondeur des hydrogels.

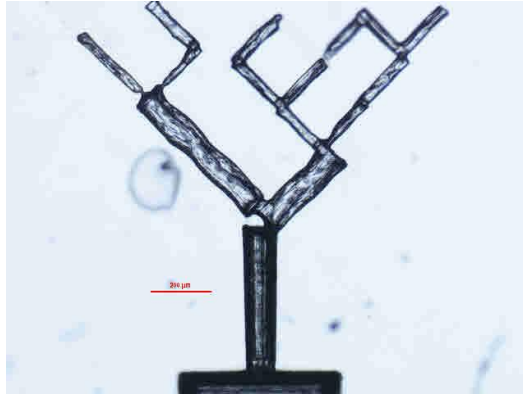


Figure 66: Capillaire dans le volume d'hydrogels obtenu par laser femtoseconde

Pour la partie modélisation, le développement d'un modèle de comportement du jet, correspondant aux jets obtenus expérimentalement par imagerie résolue en temps, pourrait permettre de mieux comprendre le phénomène, notamment sans couche absorbante, et de tester la variation de nombreux paramètres rapidement, une fois le modèle validé.

Par ailleurs, ce modèle de comportement du jet, pourrait inclure les aberrations sphériques générées lors de la traversée de l'épaisseur de bioencres pour la bioimpression sans couche absorbante. Aussi, il pourrait comprendre différentes caractéristiques des bioencres (absorption, viscosité, tension de surface, épaisseur traversée, ON ...). L'ensemble de ces modélisations serait un atout pour enrichir la connaissance et donc la maîtrise du procédé de bioimpression sans couche absorbante.

1. E. Biver, L. Rapp, A.-P. Alloncle, and P. Delaporte, "Multi-jets formation using laser forward transfer," *Appl. Surf. Sci.* **302**, 153–158 (2014).
2. C. F. Brasz, J. H. Yang, and C. B. Arnold, "Tilting of adjacent laser-induced liquid jets," *Microfluid. Nanofluidics* **18**, 185–197 (2015).

## 6 Annexes

<b>6</b>	<b>Annexes .....</b>	<b>168</b>
<b>A.</b>	<b>L'alginat .....</b>	<b>170</b>
<b>B.</b>	<b>Générateur de délais .....</b>	<b>171</b>
	Impression avec le procédé sans couche absorbante .....	171
	Imagerie résolue en temps (TRI) .....	172
<b>C.</b>	<b>Logiciel de la caméra, Hiris.....</b>	<b>173</b>
	Prise d'images simples par la caméra.....	173
	Prise d'images multiples en Mode Séquence .....	175
<b>D.</b>	<b>Logiciel d'analyse des images TRI.....</b>	<b>177</b>
<b>E.</b>	<b>Polynômes de Zernike.....</b>	<b>179</b>
	Description.....	179
	Quelques polynômes de Zernike avec l'aberration associée .....	180
	Egalité entre la caustique longitudinale et le polynôme de Zernike de l'aberration sphérique Z9 ..	181

## A. L'alginate

---

L'alginate est un hydrocolloïde, c'est-à-dire une substance comportant deux phases distinctes. Le composé est naturel et extrait d'algues. C'est une molécule hydrosoluble largement utilisée dans l'industrie agroalimentaire en tant que gélifiant. En solution, elle limite la mobilité de l'eau et joue donc un rôle dans le comportement rhéologique de la solution.

La molécule est un polymère formé de deux monomères liés : l'acide D-mannuronique (appelé M) et l'acide L-gulonique appelé G) (cf. Figure 67).

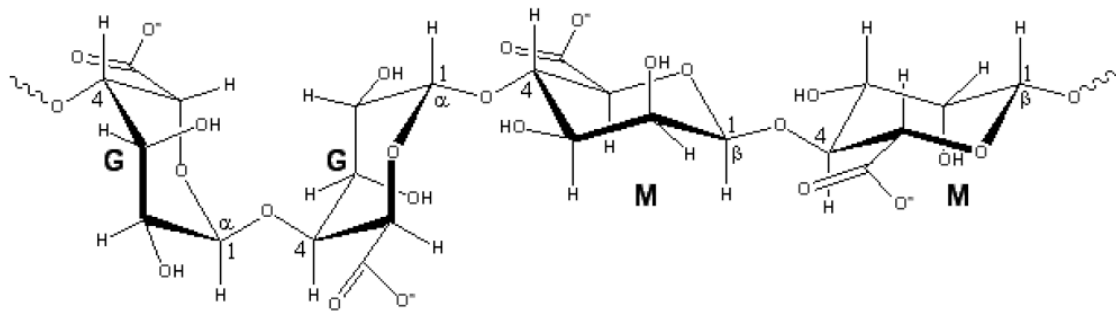


Figure 67: Unité de base de l'acide alginique.

L'alginate consiste en des blocs d'association de monomères : soit MMMM..., GGGG..., ou GMGM... Ce sont les proportions, la distribution et la longueur de ces blocs qui vont déterminer les propriétés physico-chimiques de l'alginate. Les blocs GG donnent la capacité à former un gel, tandis que MM et MG donnent de la flexibilité aux chaînes d'acide uroniques. Des plus flexibles au moins flexibles, on retrouve les blocs MG puis MM et enfin GG. La composition des alginates varie selon le type d'algues dont ils proviennent.

La viscosité d'une solution d'alginate dépend de la concentration en alginate et du nombre de monomères dans les chaînes MM, GM et GG. Des chaînes de monomères plus longues résultent en des viscosités plus importantes, à concentrations égales.

L'alginate de sodium est extrait d'une large variété d'algues de la branche des Phaeophyceae. Le composé chimique de l'alginate de sodium est le sodium de sel d'acide alginique. Sa formule empirique est  $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$ . La présence d'alginate de sodium dans l'alimentation et sur la peau ne présente pas de risques pour la santé.

## B. Générateur de délais

---

Le générateur de délais (DG645, Stanford Research Systems, Optoprim, France) est représenté ci-dessous :

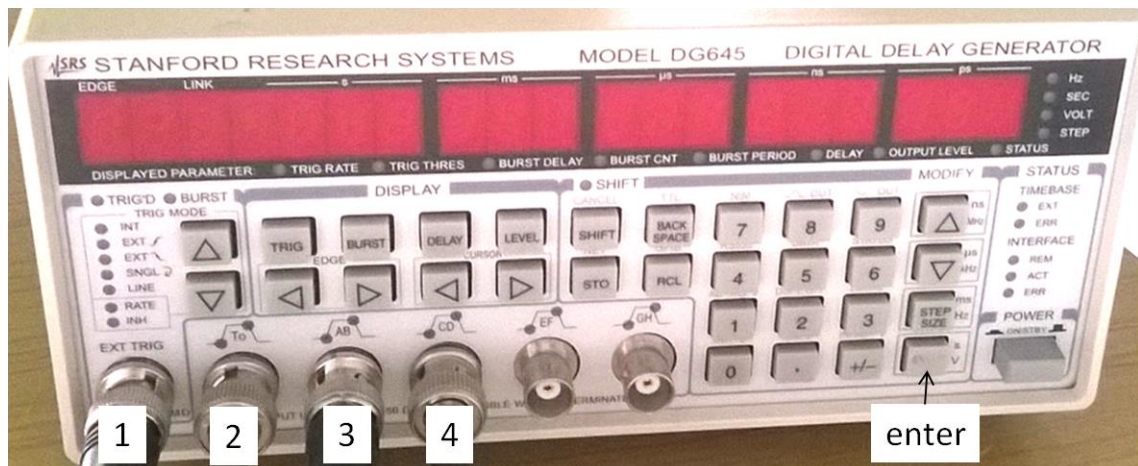


Figure 68 : Façade du générateur de délais DG645.

### Impression avec le procédé sans couche absorbante

Pour imprimer avec le montage sans couche absorbante, le générateur de délais est utilisé pour déclencher les impulsions laser. En effet, ce dispositif permet de déclencher une impulsion laser à la demande correspondant à l'impression d'une goutte de bioencre.

Le générateur dispose de plusieurs voies (cf. Figure 68). Ici celles qui nous intéressent sont :

- la voie 1 « EXT TRIG » est reliée à la sortie « TRIGGER IN » du laser et permet de déclencher une impulsion laser
- la voie 3 « AB » est reliée à la sortie « GATE » du laser et permet de laisser sortir l'impulsion déclenchée



- 1) Le mode d'utilisation est sélectionné sur la gauche de la façade en appuyant sur le bouton « TRIG » puis en sélectionnant avec les boutons de flèches haut et bas le mode « EXT + pictogramme flèche vers le haut ».
- 2) La durée du signal de tension positive de la voie 3 est réglée avec le bouton « DELAY », sous la partie « DISPLAY » de la façade, puis avec les boutons de flèches gauche et droite pour sélectionner la voie 3. Enfin, le clavier numérique permet d'entrer une valeur. La valeur réglée doit être supérieure à la durée d'une impulsion laser (800 fs). Elle était de 2,5  $\mu$ s.
- 3) Puis, le bouton « ENTER » permet de déclencher l'impulsion laser.

## Imagerie résolue en temps (TRI)

Le générateur dispose de plusieurs voies (cf. Figure 68):

- la voie 1 « EXT TRIG » est reliée à la sortie « TRIGGER IN » du laser
- la voie 2 « To » est reliée à la caméra CCD
- la voie 3 « AB » est reliée à la sortie « GATE » du laser
- la voie 4 « CD » est reliée à la diode laser

- 1) Le mode d'utilisation est sélectionné sur la gauche de la façade en appuyant sur le bouton « TRIG » puis en sélectionnant avec les boutons de flèches haut et bas le mode « EXT + pictogramme flèche vers le haut ».
- 2) La durée du signal de tension positive des voies 3 et 4 est réglée avec le bouton « DELAY », sous la partie « DISPLAY » de la façade, puis avec les boutons de flèches gauche et droite pour sélectionner la voie 3 ou 4. Enfin, le clavier numérique permet d'entrer une valeur pour la durée du signal de tension positive.
- 3) Puis, le bouton « ENTER » permet de déclencher l'impulsion laser.

Remarque : Le logiciel de la caméra Hiris doit être lancé et paramétré pour permettre la prise d'images lors du déclenchement de l'impulsion laser.

## C. Logiciel de la caméra, Hiris

### Prise d'images simples par la caméra

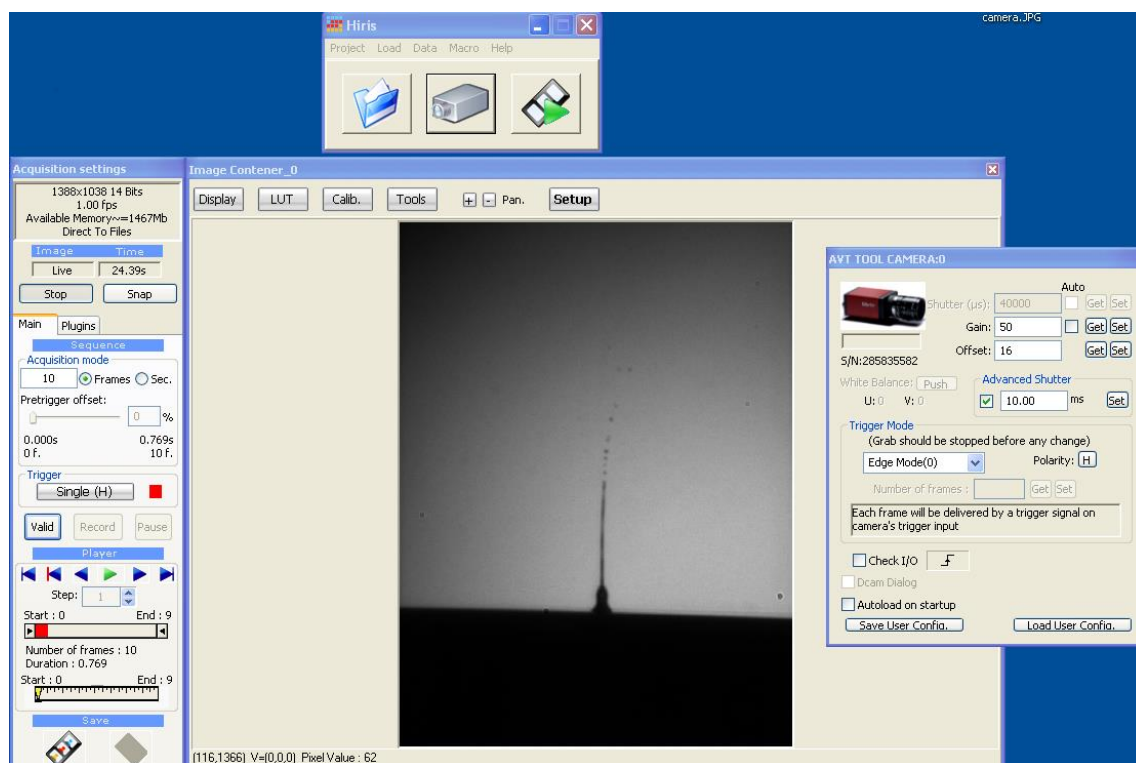


Figure 69 : Principaux écran du logiciel Hiris contrôlant la prise d'images de la caméra.

- 1) Lancer le logiciel Hiris. Puis, cliquer sur l'icône caméra. Sur la fenêtre qui s'ouvre appuyer sur LOAD. Une nouvelle fenêtre s'ouvre (elle servira à changer certains paramètres de la caméra). Appuyer sur OK.
- 2) Configurer le logiciel comme ci-dessous:

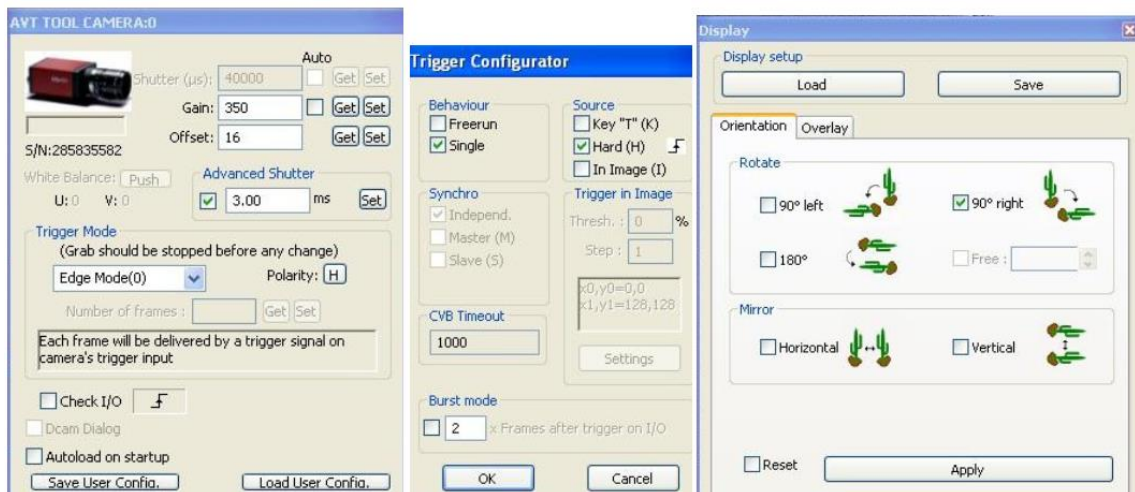


Figure 70 : Principaux réglages du logiciel Hiris.

- 3) La fenêtre AVT TOOL CAMERA s'ouvre en activant le petit onglet Hiriscam\_AVT qui se trouve dans plugins (à côté de MAIN juste sous LIVE); la fenêtre Trigger Configurator s'ouvre en appuyant sur le bouton « DISABLED » aussi nommé « SINGLE(H) » de la fenêtre Acquisition Settings; la fenêtre Display en appuyant sur le bouton « display ».

#### Description de AVT TOOL CAMERA:

- A chaque changement appuyer sur SET sinon le changement ne sera pas pris en compte.
  - Shutter ( $\mu$ s) : temps pendant lequel le shutter de la caméra va rester ouvert
  - Gain : gain de l'image : entre 0 et 600. plus le gain est élevé plus l'image sera lumineuse. Utile lors des zooms avec la caméra.
  - Advanced shutter : pour augmenter le shutter (mettre sur 3 ms)
  - Dans trigger mode :
    - Freerun : la caméra fonctionne sans attendre le trigger.
    - Edge mode : la caméra attend le trigger (c'est ce mode qu'il faut sélectionner)
    - Changer la polarité L en H (pour une détection des signaux sur front montant)
- 4) Avant de lancer les acquisitions, appuyer sur LIVE. Après la sauvegarde d'une photo il faut ré-appuyer.

- 5) Pour sauvegarder une image: appuyer sur SNAP. L'icône en bas du logiciel va se dégriser. Cliquer et sauvegardez l'image.

## Prise d'images multiples en Mode Séquence

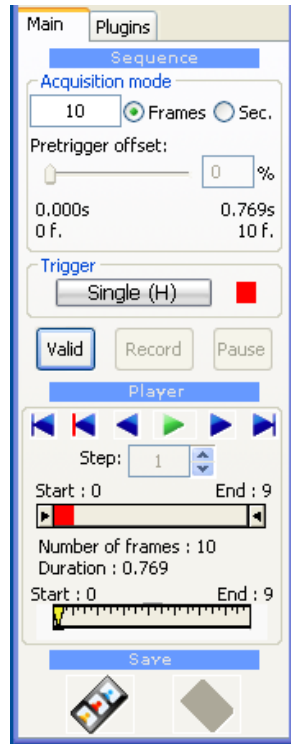


Figure 71 : Fenêtre « Acquisition settings » du logiciel Hiris de la caméra.

- 1) D'abord, il faut saisir le nombre d'images que l'on veut prendre, dans la fenêtre Acquisition settings → Acquisition mode → frames (Figure 71). Cela va permettre de créer un dossier dont la mémoire permettra d'avoir le nombre d'images voulu.
- 2) Ensuite, il faut appuyer sur « Valid » pour créer un dossier. Une fenêtre va s'ouvrir pour enregistrer le dossier. Le dossier se trouvera automatiquement dans le dossier Séquence. Il faut également inscrire un nom de fichier pour qui sera donné aux fichiers du dossier avec un numéro différent. Le dossier enregistré aura pour nom la date et l'heure à laquelle il a été créé.

- 3) Pour commencer l'enregistrement des images, il faut appuyer sur « Record » qui sera grisé. Pour prendre les différentes images, il faut créer une impulsion avec le générateur de délai.
- 4) Lorsque le nombre d'images est égal au nombre d'images voulu, il faut réappuyer sur « Record ». Si le nombre d'images est supérieur au nombre d'images voulu, il écrasera les premières images pour enregistrer les dernières images prises.

Le bouton « Pause » permet de faire une pause dans l'enregistrement des images.

## D. Logiciel d'analyse des images TRI

Un logiciel développé par le CELIA permet de mesurer rapidement les hauteurs de jet de bioencres à partir des images TRI enregistrées par la caméra (Figure 72).

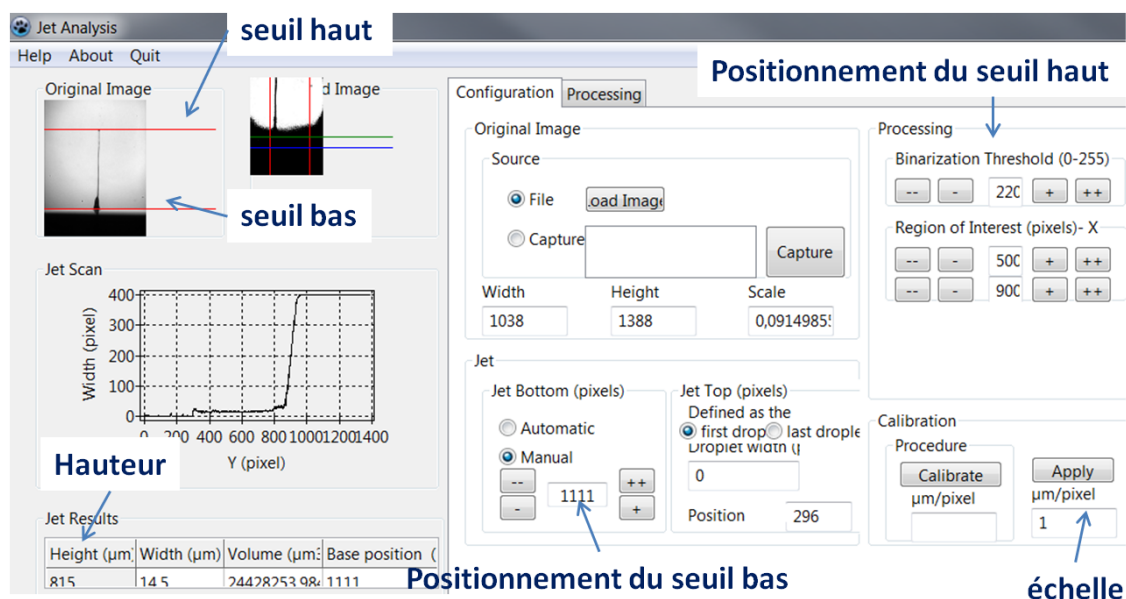


Figure 72 : Logiciel d'analyse des images TRI.

Procédure :

- 1) Sélectionner l'image à analyser. Dans l'onglet configuration, « Original Image », « Source File », Bouton Load Image, Sélection de l'image \*.bmp
- 2) Rentrer l'échelle. Dans « Calibration », « μm/pixel », entrer la valeur puis appuyer sur le bouton « Apply ».
- 3) Sélection du mode de mesure (première ou dernière goutte du jet). Seul le mode première goutte du jet fonctionne. Il correspond à la première rupture de la colonne du jet en gouttes.
- 4) Positionnement du seuil bas de mesure du jet. Dans « Jet », « Jet bottom », sélectionner « automatic » pour une détection automatique du seuil ou sélectionner « manual » pour une détection manuelle du seuil à régler avec les boutons « ++ » « -- ». Pour visualiser précisément le seuil bas, aller dans

« original image », cliquer sur l'image chargée. Un zoom de l'image et des seuils apparaît alors.

- 5) Positionnement du seuil haut de mesure du jet. Dans « processing », « binarization threshold », régler la valeur du seuil haut avec les boutons « ++ » « -- ». Un aperçu en temps réel est disponible sur « Original Image » ou on peut voir la position précise du seuil en cliquant sur « original image ».
- 6) Mesure de la hauteur du jet. La mesure entre les seuils haut et bas, en fonction de l'échelle entrée, est visualisable dans « jet results », « height ». La valeur est donnée en  $\mu\text{m}$ .

Remarque : Les mesures de largeur et de volume (« width » et « volume » dans « jet results ») ne fonctionnent pas bien. Les valeurs n'ont donc pas été prises en compte.

## E. Polynômes de Zernike

---

### Description

Ces polynômes sont le fruit du travail de Frederick Zernike, prix Nobel de physique en 1953. Ils permettent de décrire les aberrations des systèmes optiques.

En pratique, ce sont des fonctions paires et impaires, composées d'un polynôme du rayon  $R_n^m(\rho)$  et d'une fonction trigonométrique sinus ou cosinus. Elles sont décrites par les équations suivantes:

Fonctions paires :

$$Z_n^m(\rho, \varphi) = R_n^m(\rho) \cos(m\varphi)$$

Fonctions impaires :

$$Z_n^{-m}(\rho, \varphi) = R_n^m(\rho) \sin(m\varphi)$$

Avec  $m$  et  $n$  entiers naturels non nuls,  $n \geq m$

$\Phi$  l'angle d'azimuth en radians

$\rho$  la distance radiale normalisée

Les polynômes radiaux sont définis comme :

$$R_n^m(\rho) = \sum_{s=0}^{n-m} \frac{(-1)^s (2n-m-s)!}{s! (n-s)! (n-m-s)!} \rho^{2n-2s-m}$$



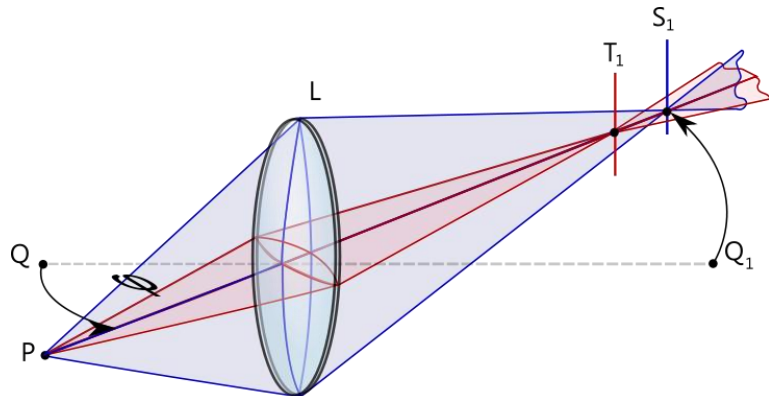
## Quelques polynômes de Zernike avec l'aberration associée

Image parfaite :

$$R_0^0(r) = 1$$

Astigmatisme :

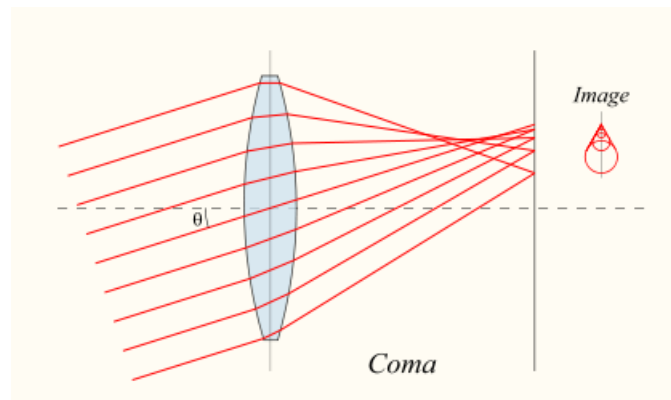
$$R_2^2(r) = r^2$$



Source: Par I, Sebastian Kroch, CC BY-SA 3.0,  
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2232585>

Aberration de coma :

$$R_3^1(r) = 3r^3 - 2r$$



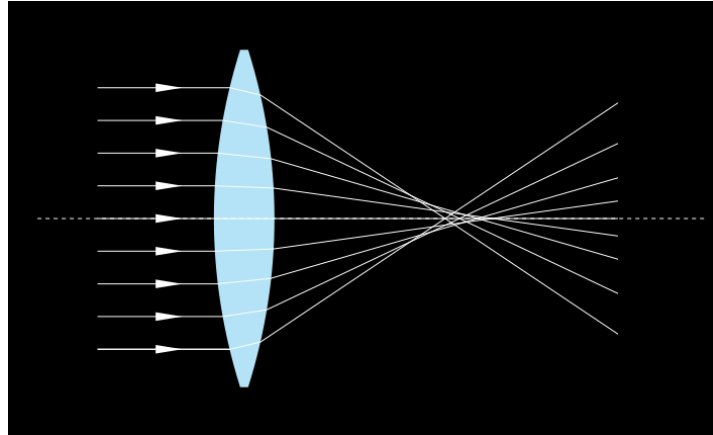
Source : <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/3/31/Lens-coma.svg>, CC BY-SA 3.0,  
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=996267>

Aberration sphérique:

$$R_4^0(r) = 6r^4 - 6r^2 + 1$$

$$R_4^0(r) = Z9$$

Sous le logiciel Zemax®, ce polynôme est référencé comme étant Z9 (notation utilisée par la suite et dans le reste du manuscrit pour le polynôme de Zernike de l'aberration sphérique)



Source : Par Pko — own drawing, Domaine public,  
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=731957>

## Egalité entre la caustique longitudinale et le polynôme de Zernike de l'aberration sphérique Z9

Le polynôme Z9 de Zernike représente, pour l'aberration sphérique, l'amplitude pic à vallée de la différence de chemin optique issue la déformation du front d'onde au point considéré, c'est-à-dire la différence de chemin optique  $n\Delta$  entre le rayon paraxial extrême et le rayon marginal extrême (Figure 73). Ainsi, on peut écrire l'équation suivante :

$$6 \times Z9 = n \times \Delta \quad (1)$$

Avec Z9, polynôme de Zernike de l'aberration sphérique

$n$ , l'indice du milieu

$\Delta$ , la différence de chemin optique  $\Delta$  entre le rayon paraxial extrême et le rayon marginal extrême

6, le coefficient de normalisation de l'aberration sphérique qui pondère le polynôme de Zernike Z9

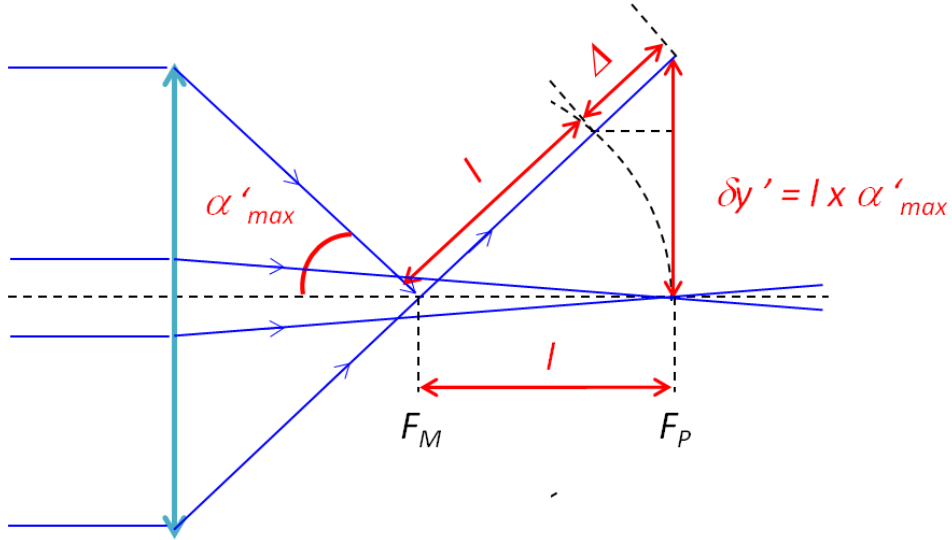


Figure 73 : Schéma de rayons marginaux et paraxiaux focalisés par une lentille dans un milieu avec de l'aberration sphérique.  $F_M$  : foyer des rayons marginaux.  $F_P$  : foyer des rayons paraxiaux.  $l$  : caustique longitudinale de l'aberration sphérique.

Pour exprimer  $Z_9$  en fonction de  $l$ , qui est la caustique longitudinale de l'aberration sphérique, et de l'ON, nous allons chercher à exprimer  $\Delta$  en fonction de  $\alpha'_{max}$ , l'angle d'ouverture image extrême. Tout d'abord, nous remarquons sur la Figure 73 que  $\delta y'$  est vaut (pour un angle  $\alpha'_{max}$  petit) :

$$\delta y' = l \times \sin \alpha'_{max} \approx l \times \alpha'_{max} \quad (2)$$

Or, on peut exprimer  $l$ , de façon classique, sous la forme suivante [1]:

$$l = a \times \alpha'^2_{max} \quad (3)$$

Avec  $a$ , coefficient dû à l'aberration sphérique

De plus, on peut exprimer  $\Delta$  comme l'intégrale de  $\delta y'$  sur  $\delta \alpha'$  entre 0 et  $\alpha'_{max}$  (i.e. l'angle d'ouverture image maximal) :

$$\Delta = \int_0^{\alpha'_{max}} \delta y' \delta \alpha' \quad (4)$$

En remplaçant  $\delta y'$  dans l'équation précédente avec l'équation (3) on obtient :

$$\Delta = \int_0^{\alpha'_{max}} a \alpha'^3 \delta \alpha' = \frac{a \times \alpha'^4_{max}}{4} \quad (5)$$

Pour éliminer le coefficient  $a$ , on exprime ce coefficient  $a$  avec l'équation (3) dans l'équation (5) :

$$\Delta = \frac{1 \times \alpha'^2_{\max}}{4} \quad (6)$$

En utilisant l'équation (1), nous avons alors :

$$6 \times Z9 = n \times \frac{1 \times \alpha'^2_{\max}}{4} \quad (7)$$

Or d'après la Figure 73, l'ON est égale à (pour un angle  $\alpha'_{\max}$  petit) :

$$ON = n \times \sin \alpha'_{\max} \approx n \times \alpha'_{\max} \quad (8)$$

Finalement en injectant la valeur de l'ON donnée par l'équation (8) dans l'équation (7), l'expression du polynôme de Zernike de l'aberration sphérique devient:

$$6 \times Z9 = \frac{1 \times ON^2}{4 n} \quad (9)$$

Où  $n$  est l'indice optique du milieu

$l$  est la caustique longitudinale d'aberration sphérique

ON est l'ouverture numérique

Z9 est le polynôme de Zernike pour l'aberration sphérique

Avec l'équation (9), la valeur  $l$  de la caustique longitudinale d'aberration sphérique, peut être liée au front d'onde aberrant grâce à Z9.

1. G. Gaussorgues, *La thermographie infrarouge: principes, technologies, applications* (Technique & Documentation, 1999).

## 7 Publications et communications

## A. En résumé

---

### Article de journal

H. Desrus, B. Chassagne, F. Moizan, R. Devillard, S. Petit, R. Kling, and S. Catros, "Effective parameters for film-free femtosecond laser assisted bioprinting" *Applied Optics* (2016).

### Acte de congrès

Congrès PHOTONIC WEST BIOS 2016, San Francisco, USA

H. Desrus, B. Chassagne, S. Catros, C. Artiges, R. Devillard, S. Petit, F. Deloison, J. C. Fricain, F. Guillemot, and R. Kling, "Laser assisted bioprinting using a femtosecond laser and a gold transductive layer: a parametric study," in (E. Duco Jansen, 2016), Vol. *Optical Interactions with Tissue and Cells XXVII*, PR 9706.

Congrès ICALEO 2014, San Diego, USA – dans le cadre des travaux réalisés à Alphanov et de la Thèse CIFRE

H. Desrus, C. Poulin, V. Germes, B. Chassagne, S. Hocquet, Q. Maouhoub, A. Morisset, R. Kling, and F. Deloison, "FABRICATION OF FRESNEL ZONE PLATE AND PHASE MASK BY INDEX CHANGE IN THE BULK OF POLYMERS WITH FEMTOSECOND LASER PULSES," in *ResearchGate* (2014).

### Chapitre d'ouvrage

O. Kérourédan, H. Desrus, M. Rémy, J. Kalisky, J. M. Bourget, J. Amédée-Vilamitjana, J. C. Fricain, S. Catros, and R. Devillard, "Laser-Assisted Bioprinting for Tissue

Engineering - **parution en sept. 2016**," in *Biomaterials & Nanotechnology for Tissue Engineering* (CRC Press, 2015).

## Communication orale

Congrès PHOTONIC WEST BIOS 2016, San Francisco, USA

H. Desrus, B. Chassagne, S. Catros, C. Artiges, R. Devillard, S. Petit, F. Deloison, J. C. Fricain, F. Guillemot, and R. Kling, "Laser assisted bioprinting using a femtosecond laser and a gold transductive layer: a parametric study," in (E. Duco Jansen, 2016), Vol. Optical Interactions with Tissue and Cells XXVII, PR 9706.

Congrès ICALEO 2014, San Diego, USA - dans le cadre des travaux réalisés à Alphanov et de la Thèse CIFRE

H. Desrus, C. Poulin, V. Germes, B. Chassagne, S. Hocquet, Q. Maouhoub, A. Morisset, R. Kling, and F. Deloison, "FABRICATION OF FRESNEL ZONE PLATE AND PHASE MASK BY INDEX CHANGE IN THE BULK OF POLYMERS WITH FEMTOSECOND LASER PULSES," in *ResearchGate* (2014).

## Communication sous forme d'affiche

Congrès Biofabrication 2015, Utrecht, Pays-bas

H. Desrus, S. Catros, C. Artiges, R. Devillard, J. C. Fricain, F. Deloison, F. Guillemot, and R. Kling, "Laser assisted bioprinting using a femtosecond laser and a gold transductive layer: a parametric study," Utrecht, Netherlands (2015).



## B. Communications écrites

---

Les communications écrites mentionnées au paragraphe A) sont présentées dans les pages suivantes :

H. Desrus, B. Chassagne, F. Moizan, R. Devillard, S. Petit, R. Kling, and S. Catros, "Effective parameters for film-free femtosecond laser assisted bioprinting," *Applied Optics* (2016).

H. Desrus, B. Chassagne, S. Catros, C. Artiges, R. Devillard, S. Petit, F. Deloison, J. C. Fricain, F. Guillemot, and R. Kling, "Laser assisted bioprinting using a femtosecond laser and a gold transductive layer: a parametric study," in (E. Duco Jansen, 2016), Vol. Optical Interactions with Tissue and Cells XXVII, PR 9706.

H. Desrus, C. Poulin, V. Germes, B. Chassagne, S. Hocquet, Q. Maouhoub, A. Morisset, R. Kling, and F. Deloison, "FABRICATION OF FRESNEL ZONE PLATE AND PHASE MASK BY INDEX CHANGE IN THE BULK OF POLYMERS WITH FEMTOSECOND LASER PULSES," in *ResearchGate* (2014).

O. Kérourédan, H. Desrus, M. Rémy, J. Kalisky, J. M. Bourget, J. Amédée-Vilamitjana, J. C. Fricain, S. Catros, and R. Devillard, "Laser-Assisted Bioprinting for Tissue Engineering – **parution en sept. 2016**," in *Biomaterials & Nanotechnology for Tissue Engineering* (CRC Press, 2015).

# Effective parameters for film-free femtosecond laser assisted bioprinting

H. DESRUS,<sup>1,2,\*</sup> B. CHASSAGNE,<sup>1</sup> F. MOIZAN,<sup>1</sup> R. DEVILLARD,<sup>1,2</sup> S. PETT,<sup>3</sup> R. KLING,<sup>1</sup> AND S. CATROS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Alphanov, Rue François Mitterrand, 33400 Talence, France

<sup>2</sup>Inserm U 1026, Bioingénierie Tissulaire (BioTis), Université Bordeaux, 146, rue Léo Saignat 33000 Bordeaux, France

<sup>3</sup>Celia, Université Bordeaux, 351, Cours de la Libération, F-33405 Talence cedex, France

\*Corresponding author: helene.desrus@gmail.com

Received 12 January 2016; revised 12 April 2016; accepted 12 April 2016; posted 13 April 2016 (Doc. ID 257364); published 10 May 2016

**Optimal conditions for femtosecond laser bioprinting setup are reported on in terms of numerical aperture and accuracy of focal spot location for different bioinks to deposit without using a metallic absorbing layer.** © 2016 Optical Society of America

**OCIS codes:** (140.0140) Lasers and laser optics; (000.2190) Experimental physics; (140.7090) Ultrafast lasers; (170.6920) Time-resolved imaging.

<http://dx.doi.org/10.1364/AO.55.003879>

## 1. INTRODUCTION

Laser Induced Forward Transfer (LIFT) is a versatile direct-writing technique that allows complex patterns to be printed with high resolution [1] from various materials (metals [2], nanoparticles [3], semiconductors [4], polymers [5], biomolecule liquid ink [6], and nanoparticle liquid ink [7]). Originally employed for copper metal deposit in the 1980s [2], LIFT is used in a wide range of applications from microelectronics [1,8,9], organic electronics [4,10], and sensors or biosensors fabrication [11–13] to tissue engineering [14–17].

A printing method for tissue engineering has emerged from LIFT: Laser Assisted Bioprinting (LAB). LAB enables cells layer-by-layer [18–20] and biomaterials to be deposited (DNA [21,22], proteins [23,24], and biomolecules [25,26]) in order to organize the components of the tissue during its manufacturing [27]. The first printing of biomaterials using a laser dates to 2001 [28] with proteins and to 2004 for cells [29–31].

The typical LAB setup is composed of a laser, a donor substrate coated with the liquid containing biological elements, the “bioink,” and a receiver substrate that receives the printed liquid. Commonly, the donor is coated with a thin absorbing metallic layer (Au: [32], Ti: [33], and Ag: [34]), with a metallic oxide layer (TiO<sub>2</sub>: [35]), or with a polymeric layer (triazene: [10,36], polyimide: [33]). The aim of this layer is to enhance the laser energy transfer to the material to be printed during the process in case of femtosecond lasers [37,38] or nanosecond lasers [31,39]. The transfer of materials transparent to the laser wavelength is not possible with nanosecond pulses and without any absorbing layer, but it is enabled with femtosecond pulses and without an absorbing layer through nonlinear absorption [40].

In this study, the LAB was film-free (no absorbing layer was used), so that one step in the process could be eliminated, and we could focus directly on the depth of the bioink using a bioink reservoir [41]. This reservoir overcomes the inhomogeneity issue of the bioink film by evaporation [32,42] or by spreading [43] when using a bioink film of several dozen microns, as is common in LAB [44]. Moreover, a film-free process avoids the particle contamination that can occur when using an absorptive layer [34]. Indeed, the bioprinted material could be altered, because the micro- and nano-metallic particles might cause DNA damage or can be cell toxic [45,46].

When a bioink reservoir is used, the position of the focal spot can be tuned in the depth of the liquid. Therefore, it would be interesting to understand how the position of the focal spot would modify the results of the bioprinting process.

In addition, it is important to choose a convenient distance between donor and receiver, i.e., the “transfer distance,” to print biomaterials.

Another important operating parameter when using a bioink reservoir is the numerical aperture (NA) of the focalization optic. Indeed, spherical aberrations, induced by the amount of liquid crossed by the laser beam, depend on the NA and could lower the laser energy transfer to the bioink. Thus the NA via spherical aberrations might impact the printing process.

This study aimed to investigate three operating parameters for a film-free femtosecond LAB: the focal spot location, the transfer distance, and the NA of the focalization optic.

First, to select the convenient transfer distance, the printing jet height was analyzed in relation to time and NA to determine the maximum jet height. Second, printing was carried out at a transfer distance corresponding to the determined maximum

jet height to verify that this transfer distance allowed printing. Third, the effect of spherical aberrations, varying with NA, was calculated with the fraction of enclosed energy in the laser spot. The jet height was then measured depending on the focalization objective location, which is linked to the focal spot location through the bioink. The objective was displaced in relation to the vernier of the micrometric stage moving this focalization optic. Finally, the longitudinal spherical aberration was calculated with the Z9 Zernike polynomial and compared to the experimental results of jet height variation when changing the focal spot location.

Time-resolved imaging (TRI) was used to analyze the jet for three NAs of the focalization optic and three model biomolecule bioinks. We varied the NA from  $NA = 0.26$  to  $NA = 0.7$  as well as the rheological properties of the bioinks such as viscosity and surface tension.

## 2. EXPERIMENTAL PROCEDURE

### A. Setup and Experimental Methods

The experimental setup of the laser bioprinting and TRI is shown in Fig. 1. It included a femtosecond S-Pulse laser (Amplitude Systemes) with 800 fs pulses at a wavelength of 1030 nm. The pulse energy was up to 34 or 257  $\mu$ J on target (800 mW at 10 kHz and 600 mW at 1 kHz), and the repetition rate extended from 1 to 10 kHz. A half-wave plate combined with a polarizing beam-splitter cube allowed us to vary the laser energy on the target. After the beam splitter, we used the optical path with p-polarized laser radiation. Two focal systems were placed behind the beam splitter: the first one was a cylindrical system with a magnification of 1.5. The purpose was to shape the beam in order to move from an elliptical spatial intensity distribution of the beam at the laser output to a circular distribution. The second, Galilean, a focal system, increased the beam diameter with a magnification of four in order to cover and completely match with the highest pupil diameter

of the microscope objectives that were used in order to focus the beam on the donor substrate.

The features of the different objectives (Plan Apo NIR-infinity corrected-objective from Mitutoyo) used in this study are summarized in Table 1. A manual micrometric stage (*M-UMR8.25* with micrometer actuator *BM17.25*, Newport) enabled the objective position in the laser propagation direction to be tuned prior to conducting the experiments with a longitudinal accuracy of 10  $\mu$ m. The criterion on the objective positioning was such that the bioink jet needs to be at its highest for a bioprinting condition and 30  $\mu$ s after the laser pulse. Briefly, the different steps to focus the laser in the bioink were: (i) generating several jets for different objective positions; (ii) measuring the specific jet heights; and (iii) determining the objective position to obtain the highest jet at 30  $\mu$ s. Thus the laser was focalized close to the bioink free surface [47,48].

The donor substrate [see inset (a) in Fig. 1] consisted of a flat microscope glass slide on which a washer had been glued. This donor formed a 1.26 mm-height tank recipient with an internal diameter of 14 mm, containing up to 129  $\mu$ L of bioink. The advantage of using this tank was the ability to obtain a homogeneous evaporation on the free surface of the bioink, contrary to a thin film of bioink where the evaporation could vary from one location to another. Thus, with this tank donor, we enhanced a practical aspect of the process: if the bioink thickness decreases with evaporation, there is no need to change the donor before bioprinting. The machine operator need only adjust the position of the optical objective. Each bioprinted drop or ejected jet of bioink was created by one laser pulse.

The bioink dynamics during LAB was observed with a TRI setup, with a temporal resolution of up to 30 ns. This setup was described in previous a study [49] and is also represented in Fig. 1. The system is a shadowgraphy-based setup consisting of a near-infrared pulse laser (810 nm, 30 ns, from Cavitron) and a CCD camera (resolution 1038  $\times$  1388 pixels) with an

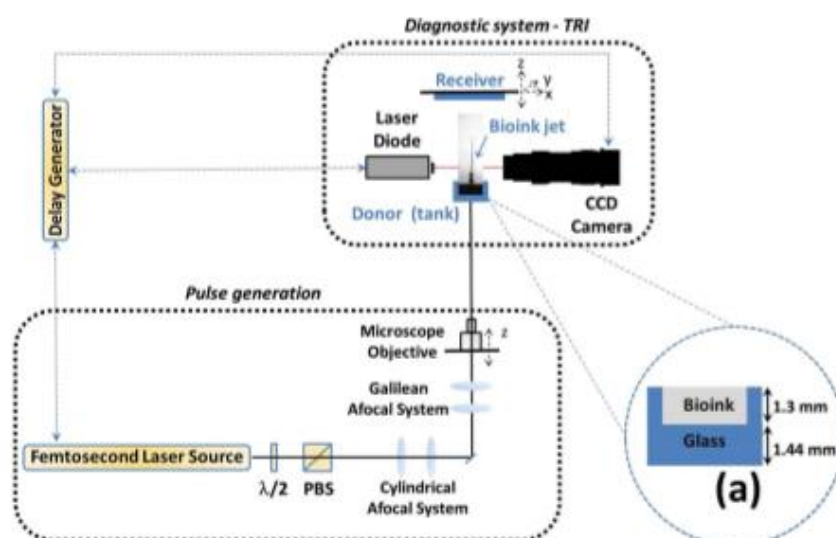


Fig. 1. Scheme of the bioprinting and TRI setup (see text for details). PBS, polarization beam splitter. Inset (a), donor substrate main dimensions.



**Table 1. Features of the Microscope Objectives Used in the Setup**

Objective Magnification	NA	Depth of Field ( $\mu\text{m}$ , in the air)	Airy Radius ( $\mu\text{m}$ , in the air)
10 $\times$	0.26	$\pm 9.3$	2.4
20 $\times$	0.4	$\pm 4$	1.6
100 $\times$	0.7	$\pm 1.3$	0.9

optical zoom. A delay generator DG645 (Stanford Research Systems) triggered the delay between the laser pulse of the LAB and image capture. The TRI setup was coupled with the general bioprinting setup in order to acquire images of bioink jets in lateral view.

For jet height measurements, special software, custom-made for the purpose, was used on TRI images. We measured the distance between the foot of the jet (at the bioink free surface) and the first disruption of it into drops. Thus we took into account in our measurements only the continuous part of the jet (examples of the jet can be seen in Fig. 4).

Moreover, the TRI system allowed the maximum height of the jet to be measured before its disruption into droplets ( $h_{\text{max}}$ ).

Each bioprinting condition was reproduced 10 times for TRI experiments. A mean jet height is thus given as the experiment output. Furthermore, the laser energy of the experiments was the energy on target (energy was measured at the objective output).

In the experiments into focus position sensitivity, the microscope objective was longitudinally moved (in the  $z$  direction) by about 200  $\mu\text{m}$  in total in order to vary the position of the focused laser pulse in the bioink. First, we moved the optical objective slightly, looking for the maximum jet height of 30  $\mu\text{s}$  after the femtosecond laser pulse with the TRI system. We chose 30  $\mu\text{s}$  because, at that time, a sufficiently high jet was observable in all tested conditions: about 500 to 1500  $\mu\text{m}$ . We then moved the objective about 100  $\mu\text{m}$  below this position toward the donor substrate. Afterward, we displaced the objective 10 by 10  $\mu\text{m}$  toward the bioink free surface until about 200  $\mu\text{m}$  of displacement.

In the bioprinting experiments, a receiver substrate was then added to the general setup (see Fig. 1). The receiver substrate consisted of a microscope glass slide that was accurately positioned with an XYZ translation stage system. The distance between the receiver and the donor substrate (transfer distance) was determined by measuring the distance ( $Z$  translation) between the position of contact between the two substrates and the position of bioprinting of the receiver. In this study, we define the transfer distance as the maximum measured jet

height ( $h_{\text{max}}$ ) that corresponds to one experimental condition comprising the type of bioink, the laser energy, and the NA used for focalizing the beam in the bioink. Finally, after the bioprinting experiment, we obtained images of the drops using an optical microscope and a 20 $\times$  objective (MF-A1010/H from Mitutoyo; ML 20 $\times$  Mitutoyo objective with NA = 0.42). This microscope was equipped with a processing unit that allowed the diameter of the drops to be measured. The resolution of the 20 $\times$  objective was about 3  $\mu\text{m}$  (Airy disk in the air).

Moreover, the printed drop diameter was evaluated with five measurements. Thus the experiment output was a bioprinted mean drop diameter.

## B. Bioinks Composition and Preparation

The composition and physical properties of the bioinks (A, B, and C) are summarized in Table 2.

We specify that bioink A, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), is used in biology for cell culture as a growth medium. We chose this bioink as a first cell-bioink model because a cell bioink is usually composed of cells in a growth medium such as the DMEM of bioink A in order to maintain cell viability. The two other bioinks B and C were selected to evaluate the effect of rheological parameters, such as viscosity, on bioprinting. Bioink B contained 90% (v/v) distilled water, 10% (v/v) glycerol, and 15 mg/ml of Bovine Serum Albumine (BSA). Bioink C was made of the same components with the addition of 1% (w/v) sodium alginate, whereas the BSA was replaced by 2 mg/ml of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Bioinks B and C are model bioinks conceived to minimize evaporation with glycerol and to promote spreading over the free bioink surface with the surfactant components BSA and SDS. The viscosity increases using the sodium alginate and glycerol. They have been used in numerous studies [32,36,43,49–51].

A stress-imposed rheometer was used to measure these dynamic viscosities at 20°C. To measure the bioink surface tension, the density was first quantified with an oscillating U-Tube density meter (DMA 4500 M, Anton Paar) with 0.00005 g/cm<sup>3</sup> of density measurement accuracy. Then a drop tensiometer (TRACKER M, Teclis Instruments), with dedicated software and using the pendant drop method, was used to measure the surface tension.

Bioinks A and B are the less viscous bioinks with viscosities of 1.28 and 1.5 mPa·s, and they have a similar viscosity to that of water (~1 mPa·s). In contrast, bioink C is about 13 times more viscous than the two other bioinks. Bioink A is characterized by the highest surface tension with 73.5 mN/m, which is similar to the surface tension of water (72.9 mN/m; [52]).

**Table 2. Composition and Corresponding Physical Properties (at 20°C) of the Bioinks**

Bioink	Composition	Viscosity (mPa·s)	Surface Tension (mN/m)	Density
A	DMEM	1.28	73.5 $\pm$ 0.8	1.0084
B	90% (v/v) water + 10% (v/v) glycerol + 15 mg/ml of BSA	1.5	55.6 $\pm$ 0.6	1.0247
C	1% (w/v) sodium alginate + 90% (v/v) water + 10% (v/v) glycerol + 2 mg/ml of SDS	19	34.4 $\pm$ 0.5	1.0257

The surface tensions of bioinks B and C are, respectively,  $55.6 \pm 0.6$  mN/m and  $34.4 \pm 0.5$  mN/m.

We spread 1 ml of the test bioink in the donor tank with a transfer pipette [see inset (a) of Fig. 1]. The level of bioink was checked with the TRI system in order to obtain a bioink thickness over 1.26 mm.

### 3. EXPERIMENTAL RESULTS AND DISCUSSION

#### A. Influence of NA on $h_{\max}$

The influence of the laser-focusing objective NA on the bioprinting process for a laser pulse of 10  $\mu$ J is shown in Figs. 2, 4–6.

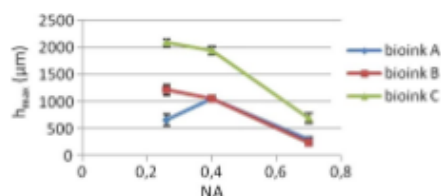
The plot in Fig. 2 represents the maximum jet height with respect to the NA of the microscope objectives. The maximum jet height  $h_{\max}$  was obtained at different times after the femto-second laser pulse for the different NA.

For bioinks B and C when NA increased from 0.26 to 0.7,  $h_{\max}$  decreased, respectively, from 1200 to 250  $\mu$ m and from 2100 to 700  $\mu$ m. The decrease of  $h_{\max}$  was greater for NA = 0.4 to NA = 0.7: the slopes were about two to four times higher than the slopes for NA = 0.26 to NA = 0.4. For bioink A when NA increased from 0.26 to 0.4,  $h_{\max}$  increased from 650 to 1050  $\mu$ m, whereas  $h_{\max}$  decreased for the two other bioinks.

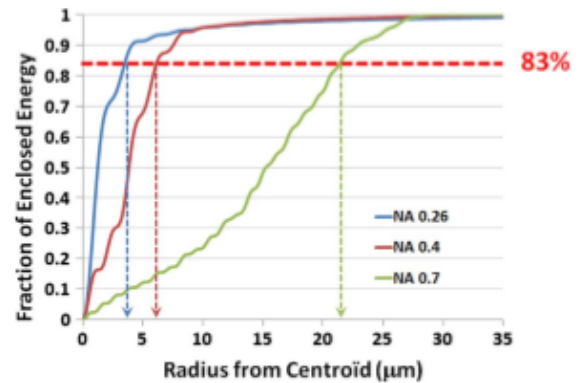
The decrease of  $h_{\max}$  for bioinks B and C when NA increased from 0.26 to 0.7 might be explained by the amount of spherical aberration in the optical path. Indeed, when the NA increases for constant pulse energy, the fluence (energy by surface unit) should increase and leads to higher kinetic energy in the jet and thus generates a higher jet. However, we observed the opposite evolution for  $h_{\max}$ .

#### B. Calculation of Spherical Aberration

The ray-tracing software code Zemax (Radiant Zemax, Redmont, WA, USA) was used to calculate the spherical aberration of our system (for our “on-axis” configuration, it is the only residual aberration), mainly due to the refraction of the rays passing through the donor substrate (silica glass: thickness 1.44 mm, bioink thickness: 1.26 mm with an optical index of 1.33), with respect to NA. Figure 3 shows the enclosed energy factor (i.e., the fraction of the total energy that fell within a circle) with respect to the centroid radius of the beam pattern on the free surface of the bioink. It is regarded as a useful parameter to assay the quality of focalization. Given that the definition of the perfect nonaberrated Airy radius contains 83% of the diffracted light intensity, we observed in Fig. 3 that the equivalent spot-size diameters for our system, on the free



**Fig. 2.** Influence of the NA on the bioprinting jet for a laser pulse of 10  $\mu$ J. Maximum height of the jet  $h_{\max}$  with respect to the NA for the three bioinks.



**Fig. 3.** Calculated radial enclosed energy incident on the free-surface plane of the bioink with respect to the NA, illustrating the effect of spherical aberration due to donor substrate (glass and bioink), on the beam. Values of spot radius that contain 83% of the diffracted light intensity are given by the vertical arrows.

surface of the bioink, are 7 (close to diffraction limit), 12, and 43  $\mu$ m, respectively, for NA 0.26, 0.4, and 0.7. It is worth remembering that the beam diameters in the air (see Table 1) for NA 0.26, 0.4, and 0.7 were, respectively, 5, 3, and 2  $\mu$ m. Thus the spherical aberration reduced the fluence on target which explains why  $h_{\max}$  diminished with an increase in NA number.

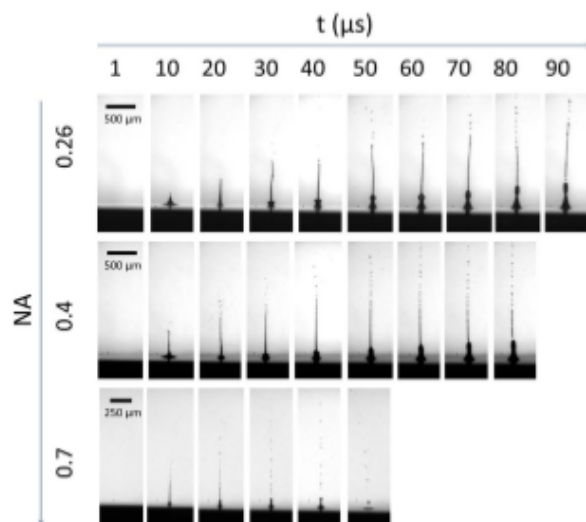
Moreover, this also explains why the three bioinks tended to generate a similar  $h_{\max}$ , especially for the highest NA = 0.7. For low NA = 0.26, as the fluence is higher because of the less significant spherical aberration, we observed higher jets, which enabled us to distinguish the different behaviors of bioinks via  $h_{\max}$ . Thus at low NA = 0.26,  $h_{\max}$  was more sensitive to the rheological properties of the bioinks. Bioinks A and B have similar viscosities (respectively, 1.28 and 1.5 mPa) but different surface tensions ( $73.5 \pm 0.8$  mN/m for bioink A and  $55.6 \pm 0.6$  mN/m for bioink B). Therefore, the differing surface tensions could explain the different  $h_{\max}$  values for bioinks A and B at NA = 0.26.

The discrepancy upon  $h_{\max}$  and the slopes between bioink C compared to bioinks A and B was assimilated to the significant viscosity discrepancy between these bioinks: bioink C is about 13 times more viscous than bioinks A and B (see Table 2). Even at NA = 0.4,  $h_{\max}$  is two times higher for bioink C than for bioinks A and B, whereas  $h_{\max}$  is similar for bioink A and B, which have the same viscosity and different surface tensions. Therefore, it is reasonable to hypothesize that viscosity plays a more important role than surface tension to create  $h_{\max}$ .

#### C. Temporal Evolution of the Jet

The TRI images in Fig. 4 represent the temporal evolution of the jet for bioink B and NA = 0.4. It is worth noting that the  $h_{\max}$  values given in Fig. 2 were determined with such TRI temporal experiments. In Fig. 4, the bioink deformation appeared 10  $\mu$ s after the femtosecond laser pulse in jet form. This jet was then composed of a large amount of liquid at its bottom, which formed its “foot,” and of a thin thread of liquid that rose from the foot. The foot of the jet grew throughout imaging, i.e., until 90, 80, and 40  $\mu$ s, respectively, for NA = 0.26, 0.4, and 0.7,

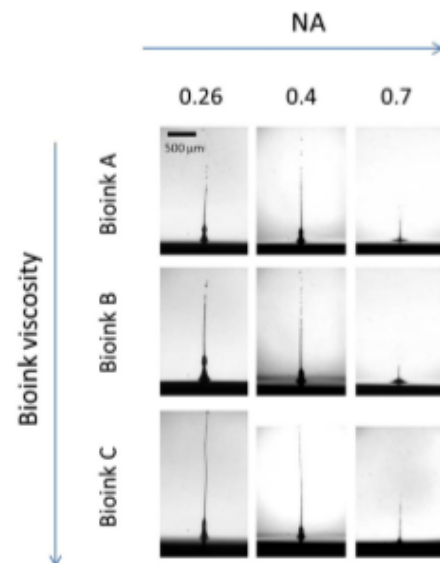




**Fig. 4.** Influence of the NA on the bioprinting jet for a laser pulse of 10  $\mu$ J. Temporal evolution of the jet for bioink B for NA = 0.26 to 0.7.

whereas the jet height, which comprises the foot plus the thread of liquid in a continuous item, grew until 70, 40, and 10  $\mu$ s after the femtosecond laser pulse, respectively, for NA = 0.26, 0.4, and 0.7. After these times, the jet height decreased. Notably, a disruption of the foot of the jet from the thin thread occurred at 80  $\mu$ s for NA = 0.26 or 0.4 and at 20  $\mu$ s for NA = 0.7. In addition, the top of the jet broke off into drops (from 30 to 70  $\mu$ s, from 20 to 80  $\mu$ s, and from 10 to 40  $\mu$ s, respectively, for NA = 0.26, 0.4, and 0.7), and the number of drops increased significantly for times longer than 70, 40, and 10  $\mu$ s for NA = 0.26, 0.4, and 0.7. The times for the increase in the number of drops corresponded to the times of maximum jet heights. It is preferable to avoid the disruption of the jet into many drops for bioprinting because this can lead to printing of satellites' drops [36,49] and then reduce the control over the whole process (lack of control on the location and the number of the printed drops). As the number of drops behind the jet is less significant for times below or equals the time for maximum jet height (i.e., 70, 40, and 10  $\mu$ s for NA = 0.26, 0.4, and 0.7), the heights for shorter times seem suitable parameters for the donor-to-receiver distance (transfer distance) when bioprinting. Moreover, a larger bioprinting transfer distance is easier to handle when setting the experiment up and is thus more realistic for an industrial bioprinting process because it requires less accuracy on the distance to setup. Therefore we selected the maximum jet height,  $h_{\max}$ , as the donor-to-receiver distance for our bioprinting experiments.

The TRI images in Fig. 5 show the evolution of maximum jet height with respect to NA and for the three bioinks. Here the foot of the jet was high for low NA, and then it decreased with the increase in NA. Moreover, the foot of the jet was larger for low-viscosity bioinks (A and B) than for bioink C, which had a higher viscosity number. Hence, taken together with the results in Fig. 2, these results show that the higher the jet, the lower the foot of the jet.

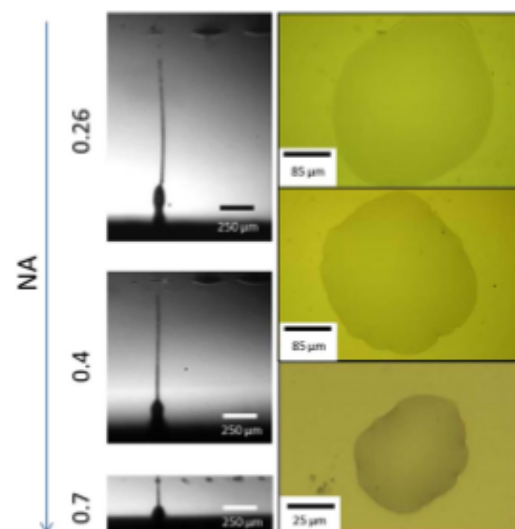


**Fig. 5.** Influence of the NA on the bioprinting jet for a laser pulse of 10  $\mu$ J. TRI images of jet at  $h_{\max}$  for the different bioinks with respect to NA.

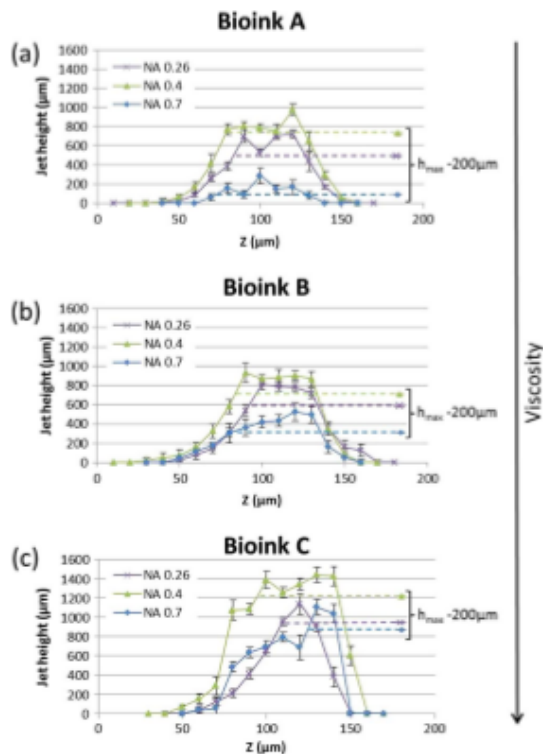
Figure 6 shows TRI images for bioink B at the maximum jet height,  $h_{\max}$ , for bioprinting experiments (left) and corresponding printed drops (right) with respect to NA. The printed drops are almost circular. They are serrated because of the evaporation after the printing. Moreover, the printed drop diameter was evaluated: it decreased when NA increased. It is of 300  $\mu$ m for NA = 0.26, 287  $\mu$ m for NA = 0.4, and 63  $\mu$ m for NA = 0.7.

#### D. Influence of the Laser-Focusing Longitudinal Position Z

The influence of the laser-focusing longitudinal position on the jet height was also studied with the three bioinks A, B, and C. The results are shown in Fig. 7.



**Fig. 6.** Influence of the NA on the bioprinting jet for a laser pulse of 10  $\mu$ J. TRI images of jet with a receiver (left) and images of the corresponding bioprinted drops (right) for bioink B.



**Fig. 7.** Experimental influence of the longitudinal laser-focus location on bioinks A, B, and C. Jet heights were measured at 30  $\mu\text{s}$  after the arrival of the focalized pulse (see text for details; laser pulse energy: 8  $\mu\text{J}$ ).

First, it is worth noting that the jet height is at its maximum for  $\text{NA} = 0.4$  for all bioinks, even if the difference between the maximum jet height of  $\text{NA} = 0.4$  and  $\text{NA} = 0.26$  for bioink B is weak, 933 toward 813  $\mu\text{m}$ , respectively. Second, in view of setting up and designing a tolerant industrial bioprinting machine, the main interesting result in Fig. 7 is that for all bioinks and for  $\text{NA} = 0.4$ , the shape of the curves reaches a plateau of equal jet height value. The corresponding longitudinal displacement range ( $\sim 40 \mu\text{m}$ ) of this equivalent field depth is much higher than the depth of field shown in Table 1 (4  $\mu\text{m}$  in the air) expected for such a  $\text{NA} = 0.4$  aberration-free working system.

We found that this equivalent depth-of-field range is mainly due to longitudinal spherical aberration. Indeed, for  $\text{NA} = 0.4$ , the optical simulation of the system yields a value of  $0.43 \times \lambda$  for the Z9 Zernike polynomial [the peak-to-valley value for spherical aberration is typically given by  $Z9 = \lambda \times (6\rho^4 - 6\rho^2 + 1)$ , where  $\rho$  is the normalized radius of the pupil of the system]. The value  $l$  of the longitudinal spherical aberration can be related to the aberrant wavefront with Z9 by using the following formula:

$$\frac{l \times \text{NA}^2}{4} = \frac{6 \times Z9}{n}, \quad (1)$$

where  $n$  is the optical index of the medium and  $\text{NA}$  is the numerical aperture.

**Table 3.** Accuracy of the Microscope Objective Location to Get a Jet Height Such as  $h > h_{\text{max}} - 200 \mu\text{m}$  for All Three Bioinks and for all NA of the Microscope Objectives

NA	0.26	0.4	0.7
$\Delta z$ ( $\mu\text{m}$ )—Bioink A	30	40	50
$\Delta z$ ( $\mu\text{m}$ )—Bioink B	30	40	50
$\Delta z$ ( $\mu\text{m}$ )—Bioink C	10	40	10

For  $\text{NA} = 0.4$ ,  $n = 1.33$ ,  $\lambda = 1.03 \mu\text{m}$ , and  $Z9 = 0.43 \times \lambda$ , we found that  $l = 50 \mu\text{m}$  was in line with the longitudinal  $z$ -range observed in Fig. 4. Similarly for  $\text{NA} = 0.26$ , despite the system being roughly paraxial, we found  $l = 23 \mu\text{m}$  ( $Z9 = 0.08 \times \lambda$  in that case), a value that is also in line with the experimental reported results in Fig. 7. It was more difficult to find a good correlation for  $\text{NA} = 0.7$  where the calculated  $l$  was 130  $\mu\text{m}$ , because we had already seen before that, in this case of very high NA, the incident fluence on the target was reduced due to the spreading of the beam.

In addition, according to Fig. 7, we defined a practical parameter for the bioprinter operator: the  $z$  tolerance to obtain a jet higher than  $h_{\text{max}} - 200 \mu\text{m}$ . Figure 7 corresponded to the  $z$  variation of the microscope objective, which focalized the laser in the bioink to produce the jet height,  $h$ , such as  $h > h_{\text{max}} - 200 \mu\text{m}$ . The results are presented in Table 3. A  $z$  tolerance in the process was noticed from  $10 \pm 5 \mu\text{m}$  to  $50 \pm 5 \mu\text{m}$  depending on the bioink and the NA. The minimum tolerance was observed for bioink C, which is the more viscous with 19 mPa.s. This  $z$  tolerance is interesting for setting up a bioprinter: a range of  $10 \pm 5 \mu\text{m}$  to  $50 \pm 5 \mu\text{m}$  on the position of the objective, depending on the system, is tolerated to obtain a minimum jet height of  $h_{\text{max}} - 200 \mu\text{m}$ , depending on the bioink and objective NA. Thus the objective location needed to be controlled accurately (from 10 to 50  $\mu\text{m}$  depending on the experimental condition; see Table 3). In contrast, the location of the receiver between  $h_{\text{max}}$  and  $h_{\text{max}} - 200 \mu\text{m}$  was very tolerant and within the range of a conventional, standard off-the-shelf mechanical component.

#### 4. CONCLUSION

We have reported on a femtosecond LAB setup using a film-free process and a  $\sim 1 \text{ mm}$ -height bioink reservoir. A single-step laser bioprinting method was developed without bioink thickness inhomogeneity issues related to the use a bioink thin film. In this study, three bioinks with various surface tensions and viscosity properties were successfully bioprinted. Heights and behaviors of the bioink jet during the process were characterized by TRI.

The NA of the objective and the laser focalization position  $z$  in the bioink depth have a significant impact on the maximum bioink jet height long before the rheological properties of the three bioinks (i.e., the jet height variation due to NA or focalization position  $z$  is larger than the jet height variation due to bioink rheological properties). As a consequence, they are crucial parameters to optimize in order to tightly control bioprinting. Furthermore, the optimal NA value to use in our LAB apparatus was determined: it is  $\text{NA} = 0.4$ . Indeed, for



NA = 0.4 and the three bioinks, a significant objective  $z$  displacement (i.e., 40  $\mu\text{m}$ ) was found experimentally to produce equal jet height values in a plateau. These results are in line with optical calculations performed with Zemax software, which suggests that this high field depth is due to the amount of spherical aberration appearing during the beam propagation through the donor slide and the bioink. Moreover, we determined a practical parameter for the bioprinter operator: the  $z$  tolerance of the objective position to produce a jet between the maximum jet height  $h_{\text{max}}$  and  $h_{\text{max}} - 200 \mu\text{m}$ . We found the objective position should be controlled accurately (from 10 to 50  $\mu\text{m}$  depending on the experimental condition), but the position of the receiver is tolerant to  $z$  variation (varying of 200  $\mu\text{m}$  in total) and is within range of a conventional, standard off-the-shelf mechanical component.

Finally, further femtosecond LAB studies including post-printing cells viability assays are under way.

**Funding.** Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT); ALPhANOV (CIFRE 2012/1402); Regional Council of Aquitaine; Paul Pascal Research Center (CRPP).

## REFERENCES

- C. B. Arnold, P. Serra, and A. Piqué, "Laser direct-write techniques for printing of complex materials," *MRS Bull.* **32**, 23–31 (2007).
- J. Bohandy, B. F. Kim, and F. J. Adrian, "Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser," *J. Appl. Phys.* **60**, 1538–1539 (1986).
- A. Piqué, "Digital microfabrication by laser decal transfer," *J. Laser MicroNanoeng.* **3**, 163–169 (2008).
- I. Zergioti, "Laser printing of organic electronics and sensors," *J. Laser MicroNanoeng.* **8**, 30–34 (2013).
- C. Boutopoulos, V. Tsouti, D. Goustouridis, S. Chatzandroulis, and I. Zergioti, "Liquid phase direct laser printing of polymers for chemical sensing applications," *Appl. Phys. Lett.* **93**, 191109 (2008).
- M. Duocastella, J. M. Fernández-Pradas, J. L. Morenza, and P. Serra, "Time-resolved imaging of the laser forward transfer of liquids," *J. Appl. Phys.* **106**, 084907 (2009).
- M. Baum, H. Kim, I. Alexeev, A. Piqué, and M. Schmidt, "Generation of transparent conductive electrodes by laser consolidation of LIFT printed ITO nanoparticle layers," *Appl. Phys. A* **111**, 799–805 (2013).
- A. Piqué, "Laser transfer techniques for digital microfabrication," in *Laser Precision Microfabrication*, K. Sugioka, M. Meunier, and A. Piqué, eds. (Springer, 2010), vol. **135**, pp. 259–291.
- H. Kim, J. S. Melinger, A. Khachatrian, N. A. Charipar, R. C. Y. Auyeung, and A. Piqué, "Fabrication of terahertz metamaterials by laser printing," *Opt. Lett.* **35**, 4039–4041 (2010).
- R. Fardel, M. Nagel, F. Nüesch, T. Lippert, and A. Wokaun, "Fabrication of organic light-emitting diode pixels by laser-assisted forward transfer," *Appl. Phys. Lett.* **91**, 061103 (2007).
- P. Serra, J. M. Fernández-Pradas, M. Colina, M. Duocastella, J. Dominguez, and J. L. Morenza, "Laser-induced forward transfer: a direct-writing technique for biosensors preparation," *J. Laser MicroNanoeng.* **1**, 236–242 (2006).
- M. Duocastella, J. M. Fernández-Pradas, P. Serra, and J. L. Morenza, "Laser-induced forward transfer of liquids for miniaturized biosensors preparation," *J. Laser MicroNanoeng.* **3**, 1–4 (2008).
- M. Duocastella, J. M. Fernández-Pradas, J. L. Morenza, D. Zafra, and P. Serra, "Novel laser printing technique for miniaturized biosensors preparation," *Sens. Actuators B Chem.* **145**, 596–600 (2010).
- M. Colina, M. Duocastella, J. M. Fernández-Pradas, P. Serra, and J. L. Morenza, "Laser-induced forward transfer of liquids: study of the droplet ejection process," *J. Appl. Phys.* **99**, 084909 (2006).
- B. Guillotin and F. Guillemot, "Cell patterning technologies for organotypic tissue fabrication," *Trends Biotechnol.* **29**, 183–190 (2011).
- I. T. Ozbolat and Y. Yu, "Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends," *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **60**, 691–699 (2013).
- A. Muhammad, E. Pages, A. Ducom, A. Fontaine, and F. Guillemot, "Controlling laser-induced jet formation for bioprinting mesenchymal stem cells with high viability and high resolution," *Biofabrication* **6**, 045001 (2014).
- J. A. Barron, D. B. Krizman, and B. R. Ringeisen, "Laser printing of single cells: statistical analysis, cell viability, and stress," *Ann. Biomed. Eng.* **33**, 121–130 (2005).
- A. Ovsianikov, M. Gruene, M. Pflaum, L. Koch, F. Maiorana, M. Wilhelm, A. Haverich, and B. Chichkov, "Laser printing of cells into 3D scaffolds," *Biofabrication* **2**, 014104 (2010).
- S. Catros, B. Guillotin, M. Bacáková, J.-C. Fricain, and F. Guillemot, "Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by laser-assisted bioprinting," *Appl. Surf. Sci.* **257**, 5142–5147 (2011).
- A. Karaiskou, I. Zergioti, C. Fotakis, M. Kapsetaki, and D. Kafetzopoulos, "Microfabrication of biomaterials by the sub-ps laser-induced forward transfer process," *Appl. Surf. Sci.* **208**–209, 245–249 (2003).
- M. Colina, P. Serra, J. M. Fernández-Pradas, L. Sevilla, and J. L. Morenza, "DNA deposition through laser induced forward transfer," *Biosens. Bioelectron.* **20**, 1638–1642 (2005).
- B. R. Ringeisen, P. K. Wu, H. Kim, A. Piqué, R. Y. C. Auyeung, H. D. Young, D. B. Chrisey, and D. B. Krizman, "Picoliter-scale protein microarrays by laser direct write," *Biotechnology Progress* **18**, 1126–1129 (2002).
- V. Dinca, M. Farsari, D. Kafetzopoulos, A. Popescu, M. Dinescu, and C. Fotakis, "Patterning parameters for biomolecules microarrays constructed with nanosecond and femtosecond UV lasers," *Thin Solid Films* **516**, 6504–6511 (2008).
- V. Dinca, A. Ranella, M. Farsari, D. Kafetzopoulos, M. Dinescu, A. Popescu, and C. Fotakis, "Quantification of the activity of biomolecules in microarrays obtained by direct laser transfer," *Biomed. Microdev.* **10**, 719–725 (2008).
- C. Unger, M. Gruene, L. Koch, J. Koch, and B. N. Chichkov, "Time-resolved imaging of hydrogel printing via laser-induced forward transfer," *Appl. Phys. A* **103**, 271–277 (2011).
- O. Kérouédan, H. Desrus, M. Rémy, J. Kalisky, J. M. Bourget, J. Amédée-Vilamitjana, J. C. Fricain, S. Catros, and R. Devillard, "Laser-assisted bioprinting for tissue engineering—under review," in *Biomaterials & Nanotechnology for Tissue Engineering* (CRC Press, 2015).
- B. R. Ringeisen, J. Callahan, P. K. Wu, A. Piqué, B. Spargo, R. A. McGill, M. Bucaro, H. Kim, D. M. Bubb, and D. B. Chrisey, "Novel laser-based deposition of active protein thin films," *Langmuir* **17**, 3472–3479 (2001).
- J. A. Barron, B. R. Ringeisen, H. Kim, B. J. Spargo, and D. B. Chrisey, "Application of laser printing to mammalian cells," *Thin Solid Films* **453**–454, 383–387 (2004).
- B. R. Ringeisen, H. Kim, J. A. Barron, D. B. Krizman, D. B. Chrisey, S. Jackman, R. Y. Auyeung, and B. J. Spargo, "Laser printing of pluripotent embryonal carcinoma cells," *Tissue Eng.* **10**, 483–491 (2004).
- J. A. Barron, P. Wu, H. D. Ladouceur, and B. R. Ringeisen, "Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns," *Biomed. Microdevices* **6**, 139–147 (2004).
- F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, J. Lopez, M. Faucon, B. Pippenger, R. Bareille, M. Rémy, S. Bellance, P. Chabassier, J. C. Fricain, and J. Amédée, "High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering," *Acta Biomater.* **6**, 2494–2500 (2010).
- M. S. Brown, N. T. Kattamis, and C. B. Arnold, "Time-resolved dynamics of laser-induced micro-jets from thin liquid films," *Microfluid. Nanofluidics* **11**, 199–207 (2011).
- T. Smausz, B. Hopp, G. Kecskeméti, and Z. Bor, "Study on metal microparticle content of the material transferred with absorbing film assisted laser induced forward transfer when using silver absorbing layer," *Appl. Surf. Sci.* **252**, 4738–4742 (2006).



35. C. M. Othon, X. Wu, J. J. Anders, and B. R. Ringelsen, "Single-cell printing to form three-dimensional lines of olfactory ensheathing cells," *Biomed. Mater.* **3**, 034101 (2008).
36. V. Dinca, A. Patrascioiu, J. M. Fernández-Pradas, J. L. Morenza, and P. Serra, "Influence of solution properties in the laser forward transfer of liquids," *Appl. Surf. Sci.* **258**, 9379–9384 (2012).
37. I. Zergioti, A. Karaiskou, D. G. Papazoglou, C. Fotakis, M. Kapsetaki, and D. Kafetzopoulos, "Time resolved schlieren study of sub-picosecond and nanosecond laser transfer of biomaterials," *Appl. Surf. Sci.* **247**, 584–589 (2005).
38. B. Hopp, "Femtosecond laser printing of living cells using absorbing film-assisted laser-induced forward transfer," *Opt. Eng.* **51**, 014302 (2012).
39. M. Duocastella, J. M. Fernández-Pradas, P. Serra, and J. L. Morenza, "Jet formation in the laser forward transfer of liquids," *Appl. Phys. A* **93**, 453–456 (2008).
40. C. B. Schaffer, A. Brodeur, and E. Mazur, "Laser-induced breakdown and damage in bulk transparent materials induced by tightly focused femtosecond laser pulses," *Meas. Sci. Technol.* **12**, 1784–1794 (2001).
41. A. Patrascioiu, J. M. Fernández-Pradas, J. L. Morenza, and P. Serra, "Microdroplet deposition through a film-free laser forward printing technique," *Appl. Surf. Sci.* **258**, 9412–9416 (2012).
42. F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, and B. Guillotin, "Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering," *Nanomedicine* **5**, 507–515 (2010).
43. A. Souquet, *Etude Des Processus Physiques Mis En Jeu Lors de La Microimpression D'éléments Biologiques Assistée Par Laser* (Université de Bordeaux I, 2011).
44. K. Hon, L. Li, and I. Hutchings, "Direct writing technology: advances and developments," *CIRP Ann. Manuf. Technol.* **57**, 601–620 (2008).
45. I. Papageorgiou, C. Brown, R. Schins, S. Singh, R. Newson, S. Davis, J. Fisher, E. Ingham, and C. P. Case, "The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts *in vitro*," *Biomaterials* **28**, 2946–2958 (2007).
46. A. Kroll, M. H. Pillukat, D. Hahn, and J. Schnekenburger, "Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges," *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **72**, 370–377 (2009).
47. J. R. Blake and D. C. Gibson, "Cavitation Bubbles Near Boundaries," *Annu. Rev. Fluid Mech.* **19**, 99–123 (1987).
48. A. Patrascioiu, J. M. Fernández-Pradas, A. Palla-Papaviu, J. L. Morenza, and P. Serra, "Laser-generated liquid microjets: correlation between bubble dynamics and liquid ejection," *Microfluid. Nanofluidics* **16**, 55–63 (2014).
49. M. Ali, E. Pages, A. Ducom, A. Fontaine, and F. Guillemot, "Controlling laser-induced jet formation for bioprinting mesenchymal stem cells with high viability and high resolution," *Biofabrication* **6**, 045001 (2014).
50. B. Guillotin, A. Souquet, S. Catros, M. Duocastella, B. Pippenger, S. Bellance, R. Bareille, M. Rémy, L. Bordenave, J. Amédée, and F. Guillemot, "Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization," *Biomaterials* **31**, 7250–7256 (2010).
51. J. M. Fernández-Pradas, M. Colina, P. Serra, J. Domínguez, and J. L. Morenza, "Laser-induced forward transfer of biomolecules," *Thin Solid Films* **453–454**, 27–30 (2004).
52. N. R. Pallas and Y. Harrison, "An automated drop shape apparatus and the surface tension of pure water," *Colloids Surf.* **43**, 169–194 (1990).

# Laser assisted bioprinting using a femtosecond laser with and without a gold transductive layer: a parametric study

H. Desrus<sup>\*a,b</sup>, B. Chassagnea, S. Catros<sup>b</sup>, C. Artiges<sup>d</sup>, R. Devillard<sup>a,b</sup>, S. Petit<sup>c</sup>, F. Deloison<sup>a</sup>, J.C. Fricain<sup>b</sup>, F. Guillemot<sup>d</sup> and R. Kling<sup>a</sup>

<sup>a</sup> ALPHANOV, Rue François Mitterrand, 33400 Talence, France ; <sup>b</sup> INSERM U 1026, Bioingénierie Tissulaire (BioTis), Université Bordeaux Segalen, 146, Rue Léo Saignat 33000 Bordeaux, France;

<sup>c</sup> CELIA, 351 Cours de la Libération, 33400 Talence, France; <sup>d</sup> POIETIS, allée Charles Darwin, 33600 Pessac, France

## ABSTRACT

Experimental results of femtosecond Laser Assisted Bioprinting (LAB) are reported on. Two set-up, used to print different model bioinks and keratinocytes cells line HaCaT, were studied: first one was using a femtosecond laser with low pulse energy and an absorbing gold layer, whereas the second one used high pulse energy enabling the removal of the absorbing layer. Printed drop diameter and resulting height of the bioink jet are then quantified as a function of the LAB parameters such as laser energy, focus spot location or numerical aperture.

**Keywords:** laser assisted bioprinting (LAB); time-resolved imaging (TRI); LIFT; film-free LIFT; femtosecond laser; cell printing; absorbing film-assisted laser-induced forward transfer (AFA-LIFT); shadowgraphy

## INTRODUCTION

Laser-induced forward transfer (LIFT) is a direct-writing technique, which allows printing various materials from solid state [1–3] to liquid state [4–6]. Also, it is widely employed in the domain of electronics [3,7–9]. Laser Assisted Bioprinting (LAB) [1], also called Biological Laser Printing (BioLP) [10], is the LIFT technique but applied specifically to the transfer of biological elements: aqueous solutions of biomolecules [11,12], proteins [13], DNA [14,15] and living cells [16–18]. The typical set-up for LAB comprises a laser, a donor substrate covered with the liquid containing biological elements, the “bioink”, and a receiver substrate that receives the printed liquid. In addition, for femtosecond lasers, if the energy of the laser pulse is low, there is often a laser-absorbing layer on the donor, used to enhance the laser energy transfer to the liquid, made of metal [1,19,20] or polymer [21]. In the case of metallic layer, the energy transfer will come from the following physical processes: (a) Deposition of the laser energy into the skin depth of the absorbing layer, then (b) ablation of the transductive layer with expulsion of the ablated matter under the forms of gases and dusts. During the ablation, a conversion of the absorbed energy into a mechanical energy occurs via a shock wave. Using femtosecond laser pulses, the heat-affected zone is minimized. (c) Generation and expansion of the vapor bubble, leads to (d) the deformation of the bioink-air interface, (e) and the creation of a jet due to bubble collapsing at its maximal radius. The jet progresses with constant thinning (in the absence of receiving substrate, the jet breaks due to the Rayleigh–Plateau instability). There are thus numerous parameters implied in the LAB. They can be related to the laser pulse characteristics (wavelength, pulse duration, repetition rate, energy, beam focus diameter), to the bioink properties (viscosity, thickness, surface tension) as well as the receiving substrate composition [1,10,22]. The versatility of LIFT as well as its high resolution [23], make the LAB or BioLP an interesting tool for pharmacological studies, cell biology experiments and could be used in

regenerative medicine in the future decades [16,24]. For such domains of application requiring precision, it is essential to know how precise the setting of the LAB parameters should be, to print with reproducibility.

The setting of two parameters related to the laser was investigated: the laser energy and the pulse focusing position through the bioink thickness. The laser energy had been studied by the past [11,17] because, it can help to predict the interaction of the laser pulse with the absorbing layer, which may lead to printing and thus it is a key parameter of the LAB. Besides, the set-up of the pulse focusing position through the bioink thickness was also investigated in the cases of high and low femtosecond laser pulse energy. In a classical set-up (including the absorbing layer), the laser focusing optimal location is centered to the absorbing layer. Thus, we firstly wondered how this parameter was influencing the bioink jet behavior and if there was a tolerance on the laser focusing position enabling still to print with reproducibility. A femtosecond laser pulse was employed because it might be less harmful than other lasers for biomolecules. Indeed, it had been demonstrated by Dinca et al. [25], that the bioactivity of proteins after nanosecond printing is significantly reduced compared to a femtosecond printing at the same fluence. In addition, an absorbing layer can also be used to enhance the laser energy transfer to the liquid. The layer was made of gold because of its well-known biocompatibility. When the laser pulse energy is high enough to have a set-up able to work and print without using an absorbing layer, the laser spot is then focused close to the free surface of the bioink.

## MATERIALS AND METHODS

### Set-up and laser source

The LAB technique has been described elsewhere [1,22]. The setup is composed of three main parts: a) a pulsed laser, b) an optical system to guide the pulses through the setup, and c) two substrates regarding each other. One of the substrates is named “donor” and is carrying the biomaterial to be printed. Here, the biomaterial is liquid and is called bioink. The other substrate is the “receiver” on which the bioink is printed. Moreover, all experiments, for the two set-ups, were performed using one laser pulse per printed drop or ejected jet.

#### Low energy set-up, LAB with absorbing layer :

A first set-up was using a fiber femtosecond laser (Satsuma from AMPLITUDE SYSTEMS) generating a laser wavelength of 1030 nm with a pulse duration of 350 fs, a pulse energy up to 4  $\mu$ J on target (1.6W at 400kHz) and providing a repetition rate between 200kHz and 1MHz (the maximum of energy was reached at a pulse picker frequency of 400kHz) for a  $M^2$  beam quality factor of 1.1. This first “low-energy” set-up needed an additional absorbing layer to enhance the laser energy transfer for bioink jet formation.

The set-up represented in Figure 1.A f-theta lens focused laser pulses on the donor substrate with a beam diameter of 10  $\mu$ m, and a depth of focus of about 80  $\mu$ m. Galvanometric mirrors directed laser pulses onto the donor and specific software enabled to design (on demand) 2- and 3-dimensional printing patterns with the precision up to the beam waist dimensions. Donor substrates were made of modified soda-lime glass slides (B270 glass from SCHOTT) and they were coated with a laser-absorbing layer of gold (50 nm) using a sputter coater (EMSCOPE SC500). Then, a 40 $\mu$ m-thick film of bioink was manually spread out. The receiver substrate consisted either in a sterilized quartz substrate coated with collagen for the cell printing experiments, or in a cell culture plate for the bioink printing experiments without cell. The different receivers were positioned onto a motorized 3-axis translation stage with a precision up to 1  $\mu$ m.

In fact, the spacing between donor and receiver substrates was maintained at 1 mm thanks to the receiver stage. This close spacing was possible because donor support was entering in the wells of the culture plate. In addition, the set-up of the spacing between receiver and donor was realized thanks to a tare with the zero spacing between the two substrates. The zero spacing corresponded to a receiver stage position and was determined experimentally by the mechanical contact between the two substrates. For the sterilized receiving coated with collagen, we determined the

mechanical contact between donor and receiver without collagen, assuming the collagen thickness was constant. Then, the collagen thickness was then taken into account to set-up the spacing between donor and receiver.

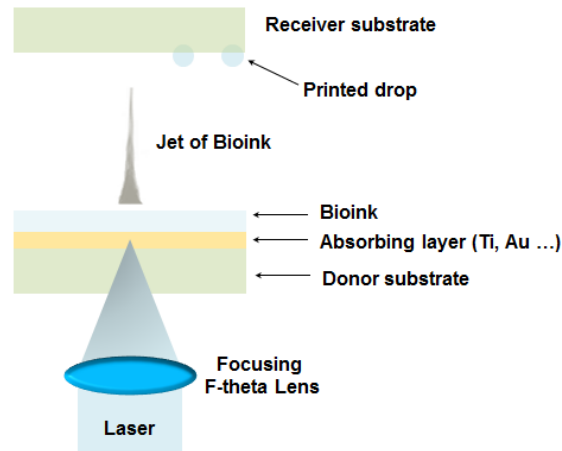


Figure 1. Scheme of low energy set-up with the laser focalization inside the absorbing layer.

#### High energy set-up, LAB without absorbing layer:

A second set-up included a femtosecond S-Pulse laser (AMPLITUDE SYSTEMS) with 800-fs pulses at a wavelength of 1030 nm. The pulse energy was up to 34 or 257  $\mu\text{J}$  on target (800 mW @ 10 kHz and 600 mW @ 1 kHz) and the repetition rate extended from 1 to 10 kHz. This second “high-energy” set-up do not need an additional absorbing layer to generate a bioink jet: the laser is directly focused inside the bioink.

The high energy set-up is slightly different to the set-up of Figure 1: no absorbing layer is present and the laser focusing optic is a microscope objective instead of a F-theta lens. It is represented in Figure 2.

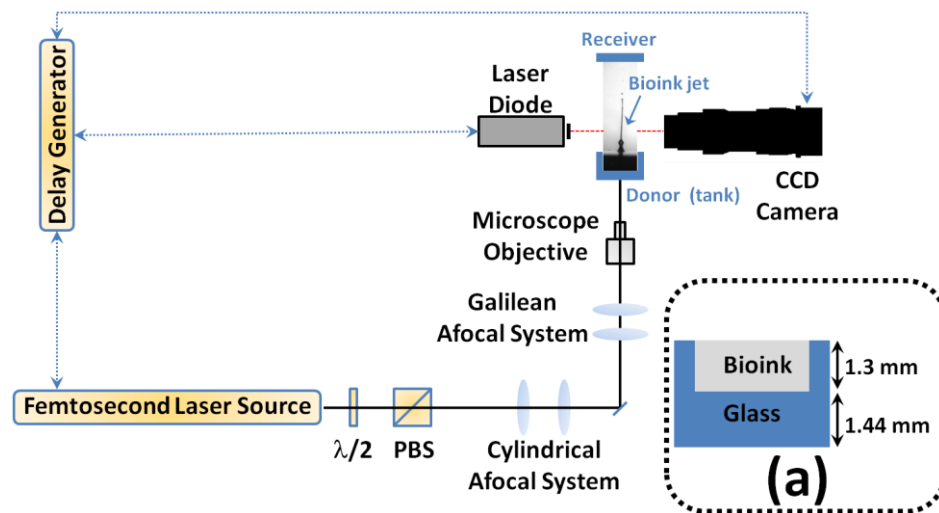


Figure 2: Scheme of high energy set-up with TRI imaging system. Inset (a), donor substrate main dimensions.

The laser energy was varied with a half-wave plate and a polarizing beam splitter cube. The p-polarized laser radiation was used after the beam splitter. The beam is then going through two afocal systems: a cylindrical and then a Galilean afocal system. The cylindrical system realized beam shaping with a magnification of 1.5. The objective was to change an elliptical spatial intensity of the laser beam to a circular intensity distribution. The Galilean afocal system expanded the beam diameter with a magnification of 4 in order to cover the highest pupil diameter of the microscope objectives, used to focus the beam on the donor substrate.

The features of the three microscope objectives (Plan Apo NIR-infinity corrected-objective from MITUTOYO) are presented in Table 2 1. The tuning of the objective position, in the laser propagation direction, was enabled by a manual micrometric stage (M-UMR8.25 with micrometer actuator BM17.25, Newport). Thus, the laser focus position prior to realizing the experiments was adjusted with a longitudinal accuracy of 10  $\mu\text{m}$ . The objective was positioned such as the bioink jet should be the highest for a bioprinting condition and 30  $\mu\text{s}$  after the laser pulse. The laser is focalized in this way close to the free surface of the liquid bioink [26,27].

Table 2 1: Features of the microscope objectives used in the set-up.

Objective Magnification	Numerical Aperture	Depth of Field ( $\mu\text{m}$ , in the air)	Airy Radius ( $\mu\text{m}$ , in the air)
10x	0.26	$\pm 9.3$	2.4
20x	0.4	$\pm 4$	1.6
100x	0.7	$\pm 1.3$	0.9

The donor substrate consists in a microscope glass slide on which a washer had been stucked. This donor was forming a  $\sim 1.3$  mm-height tank recipient with an internal diameter of 14 mm and up to 129  $\mu\text{L}$  of bioink (see Figure 2, inset (a) ). The advantage of using this tank is to obtain a homogeneous evaporation on the free surface of the bioink. Moreover, a receiver substrate, consisting in a microscope glass slide, is present in the bioprinting experiments (see Fig. 2). The receiver substrate was positioned with a XYZ manual translation stage system. The distance between the receiver and the donor substrate (transfer distance) was measured with the distance (Z translation) between the position of contact of the two substrates and the position of the receiver during bioprinting. With this set-up, the transfer distance was defined as the maximum measured jet height ( $h_{\text{max}}$ ) corresponding to one experimental condition, comprising the type of the bioink, the laser energy and the numerical aperture (NA) of the focalization microscope.

#### Time Resolved Imaging set-up:

With these two laser set-ups, the laser-induced jet formation and the liquid dynamics were observed using a 30ns-resolution Time-Resolved Imaging (TRI) setup, previously described in [28]. The images consisting in lateral view of jets were acquired by shadowgraphy using a dedicated TRI system coupled with the above-mentioned Laser Assisted Bioprinting (LAB) setup. This TRI system comprised a near infra-red (IR) pulse laser (810nm, 30ns, Cavitat, RandD Vision, France), a CCD camera (resolution 1038x1388 pixels, Stringray, AVT, RandD Vision, France) with an optical zoom (Zoom Macro Navitar, RandD Vision, France). The delay between femtosecond laser pulse and image capture was triggered using a delay generator DG645 (Stanford Research Systems, Optoprim, France).

In the high energy set-up, for jet height measurements, a dedicated analysis home-made software was used on TRI pictures. We measured the distance between the foot of the jet (at the bioink free surface) until the first disruption of it into drops. Thus we took into account in our measurements only the continuous part of the jet (examples of jet can

be seen in Fig. 4). Each bioprinting condition was reproduced 10 times for TRI experiments. Thus, a mean jet height is given as the experiment output. To determine the maximum jet heights, jet heights were measured from 10 temporal images of the jet from 10  $\mu$ s and up to 100  $\mu$ s.

## Bioinks composition and preparation

Table 2 2 Composition of the bioinks.

Bioink	Composition	Viscosity (mPa. s)
A	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	1.28
B	90% (v/v) of water + 10% (v/v) of glycerol + 15mg/ml of Bovine Serum Albumine	1.5
C	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + keratinocyte cells line HaCaT (100 millions/ml)	-

Bioink A, DMEM, is used in biology for cell culture as a growth medium to maintain cells viability. It was used as a first approach of the cell bioink printing because such bioink contains a mixture of cells plus cell culture medium. The other bioink B was selected to evaluate the effect of viscosity, onto bioprinting. Bioink B consisted in model solution designed to create a stable liquid layer over a sufficient period of time. Indeed, glycerol is added to minimize evaporation, and the surfactant BSA promotes spreading over the free bioink surface. The viscosity is increased mainly using glycerol. Similar solutions were already used in our group [22,28,29].

The dynamic viscosities of the bioinks A, B were evaluated at 20°C using a stress-imposed rheometer. We decided not to measure the viscosity of bioink C because a stress-imposed measurement, performed under high mechanical pressure, would make the bioink very inhomogeneous, due to its high cell concentration and to its mixing with only low viscous liquid (DMEM). Thus, the measurement wouldn't be comparable to those to the others bioinks. For the viscosity number, we used the Newtonian value. It corresponded to the viscosity of a newtonian fluid, which is constant when varying shear stress and shear rate during the measurement. According to Table 2 2, the bioink B is 1.2 times more viscous than the bioink A.

With the low energy set-up, a micrometric pipette was used to spread 7  $\mu$ L of bioink onto the donor, in order to obtain a bioink thickness of 40 $\mu$ m.

With the high energy set-up, a transfer pipette of 1 ml injected the bioink into the donor tank (see inset (a) of Fig. 2). The level of bioink was controlled with the TRI system in order to obtain a bioink thickness over 1.26 mm.

## Cell printing experiments

Cell printing was realized with the low energy set-up because it comprises a controlled atmosphere (humidity and temperature) under a blowing hood which is well-adapted to keep a sterilized environment and thus to manipulate cells.

### Cell culture :

HaCaT cells were cultured in plastic dishes in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM, Lifetechnologies, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Dutscher, France) and 1% antibiotics (penicillin, streptomycin,

amphotericin, PAN-Biotech, Germany), in controlled atmosphere (100% humidity, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Culture medium was changed every other day.

#### Cell containing bioink preparation :

Cells were detached from the plastic dish with a bioink of 0.025% (w/v) trypsin during 5 min at 37°C. Cells were suspended in an appropriate volume of DMEM at a cell concentration of 100 million cells/ml.

#### Receiving substrate preparation:

Only for cell printing experiments, sterilized receiving quartz substrates were coated with type 1 collagen (Dutscher, France) concentrated at 2% (v/v) in DMEM, under sterile conditions. An appropriate volume of collagen bioink was spread onto the receiving substrates in order to obtain a thickness of 200 µm. Finally, collagen was allowed to set during 30 min at 37°C prior to perform experiment.

#### Live/dead assay:

Printed cells were stained 24 h after the experiment using live/dead assay kit (Lifetechnologies, USA) according to manufacturer's instructions. The samples were incubated in DMEM supplemented with 10% FBS and 2µM calcein-AM and 4µM ethidium homodimer (EthD-1) for 20 min in controlled atmosphere (100% humidity, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### Images analysis:

The receiving substrates were observed 24 h after each experiment with a microscope Nikon Eclipse 80i (Nikon Metrology, France) equipped with digital camera Dxm1200C and the following filter set: calcein: Ex 465–495nm/DM: 505 nm/EM: 515–555 nm; and EthD-1: Ex 540–580nm/DM: 595 nm/EM: 600–660 nm. Images were analyzed with software NIS-Elements AR 3.0.

### **Bioprinting experiments**

#### Determination of the drop diameter:

The drop diameter represents the bioink printed diameter onto the receiving substrate.

For the low energy set-up, the diameters of the drops printed on the receiving substrate were measured under an inverted optical microscope (Nikon Optiphot-2, Japan) equipped with a color video camera (Sony Power HAD 3CCD, Japan) driven by dedicated software (Matrox Intellicam, Canada). The drop diameter for each energy condition was calculated as a mean value from 3 different donors. For each donor, 10 measurements were made by printing condition. Finally, 30 measurements by printing condition were performed.

For the high energy set-up, an optical measuring microscope (MF-A1010/H from MITUTOYO) was used to measure the printed drop diameters. The microscope was equipped with a processing unit with a measurement resolution up to 1 nm and a measurement accuracy up to 1 µm. Printed drop diameter was evaluated with five measurements giving a mean drop diameter as experimental output.

#### Experimental method when varying laser focus position:

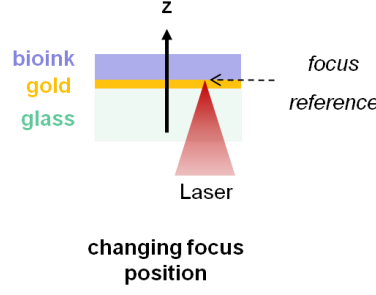


Figure 3: Scheme of the variation of the laser focus position for the low energy set-up.

In the low energy set-up configuration, the laser focus position was usually tightly focused on the gold layer in order to ablate it the most efficiently (see Figure 3). In order to evaluate the effect of varying the focus location in the longitudinal propagation on the laser beam (z-direction), the donor substrate was moved in the z direction to realize the experiments with a precision below 10  $\mu\text{m}$ . Then we observed the laser-induced jet of liquid thanks to the TRI set-up.

In the high energy set-up, for the experiments of focus position sensitivity, the microscope objective was longitudinally moved (in the z direction) of about 200  $\mu\text{m}$  in total in order to vary the position of the focused laser pulse in the bioink. First, we slightly moved the optical objective, looking for the maximum jet height 30  $\mu\text{s}$  after the femtosecond laser pulse, with the TRI system. 30  $\mu\text{s}$  was chosen because, at this time, a sufficiently high jet is observable for all tested conditions: about 500  $\mu\text{m}$  to 1500  $\mu\text{m}$ . Then we moved the objective about 100  $\mu\text{m}$  below this position, toward the donor substrate. Afterwards, we displaced the objective 10  $\mu\text{m}$  by 10  $\mu\text{m}$  toward the bioink free surface until about 200  $\mu\text{m}$  of displacement. At each displacement of 10  $\mu\text{m}$  of the objective, 10 TRI images were taken and measured. The experiment output is a mean jet height.

#### Variation of the laser fluence and energy:

In the low energy set-up, for the experiments of variation of the laser focus position, the laser fluence on target was changed by moving the laser focus position through the bioink under constant pulse energy, whereas for the printing experiments and TRI studies of the bioink, the laser fluence was varied by changing the laser pulse energy under constant focusing conditions.

In the high energy set-up when the focusing conditions weren't varied, the laser energy was tuned with the half-wave plate placed before the polarizing beam splitter cube.

#### Calculation of the laser fluence:

In the low energy set-up, we calculated the laser fluence that was varied during the experiments. This calculation was made thanks to the following steps:

First, we calculated the dimensions of the Airy disk with equation (1), which is the Fraunhofer diffraction limit for a circular aperture. It represents the minimum dimension of the laser beam focalized by an optical system. This equation is a good estimation because the  $M^2$  laser beam quality factor is 1.1. It indicates that the beam is very close to an ideal Gaussian beam  $\text{TEM}_{00}$  with a  $M^2$  of 1.

$$R_{\text{airy}} = \frac{1.22 \lambda}{2NA} \quad (1)$$

The dimension of this Airy point spread function can be roughly approximated to  $w_0$ , the laser beam waist, i.e. the laser radius at the focus position.



Then we determined the depth of focus  $2z_0$  of the scanner lens with equation (2), which is the same in the air and in the donor material:

$$2z_0 = \frac{2\pi w_0^2}{\lambda} \quad (2)$$

These two equations were used to calculate  $w(z)$  in equation (3), the laser beam radius at “z distance” from the focus position. Considering a Gaussian laser beam, we calculated  $w(z)$ :

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \frac{z^2}{z_0^2}} \quad (3)$$

Finally, we calculated the laser fluence at a specific focus position, approximating the laser beam to a disk at the focus position in equation (4):

$$F = \frac{E}{\pi w(z)^2} \quad (4)$$

With

- $R_{\text{airy}}$ , the radius of the Airy disk, the Fraunhofer diffraction limit (cm).
- $\lambda$ , the laser wavelength ( $\mu\text{m}$ ).
- NA, the numerical aperture of the scanner lens.
- $z_0$ , the half depth of focus of the scanner lens that focuses the laser beam (cm).
- $w(z)$ , the laser beam radius at “z distance” from the focus position (cm).
- $w_0$ , the laser beam waist, i.e. the laser radius at the focus position (cm).
- $z$ , the distance from the focus position in the laser propagation direction (cm).
- $F$ , the laser fluence ( $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ).
- $E$ , the laser pulse energy (J).

## EXPERIMENTAL RESULTS IN THE CASE OF A LOW ENERGY FEMTOSECOND LASER AND A GOLD TRANSDUCTIVE LAYER

### Printed drop diameter as a function of laser energy

We can see in Figure 4 that increasing the laser pulse energy results in an increase, on the receiver substrate, of the printed drops diameters for each bioink. This raise is roughly linear for all bioinks. In the case of bioinks A and B, drops diameters evolution was very similar : they were growing from  $\sim 150 \mu\text{m}$  at  $2 \mu\text{J}$  to  $\sim 170 \mu\text{m}$  at  $3.5 \mu\text{J}$ . Using bioink C (containing HaCaT cells) resulted in drop diameters that are ranging from  $110 \mu\text{m}$  at  $2 \mu\text{J}$  to  $130 \mu\text{m}$  at  $3.5 \mu\text{J}$ .

The printed drops diameter raised when increasing laser energy, from 2 to  $3.5 \mu\text{J}$ , and thus with laser fluence, from 2.5 to  $4.5 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  in this set-up. This confirms previous studies [1,30] where nanosecond laser pulse were used, and

viscous bioinks with or without cells. Moreover, Patrascioiu et al. [11] have made similar observations using a femtosecond laser pulse and a viscous bioink. Also, the quasi-linearity of these diameter curves from 2.5 to 4.5 J.cm<sup>-2</sup> has been observed for a viscous solution containing 50% (v/v) of glycerol and water plus the surfactant sodium dodecyl sulfate dissolved at a concentration of 2.0 mg/ml [5].

The viscosity of the bioinks is an important parameter that can explain some of our results. The lower the viscosity the larger the printed drops diameter at constant experimental parameters [1,12]. Thus, the similar diameters in function of energy, in Figure 4 for bioinks A and B, are explainable by their close viscosities (1.28 mPa.s for bioink A and 1.5 for bioink B).

In addition, diameters for bioink C were lower of about 40 µm than the other bioinks, for the same energy. Thus the model bioinks constitutes a first approach of printing a cell bioink but they do not fit exactly with the printed drops of the cell bioink.

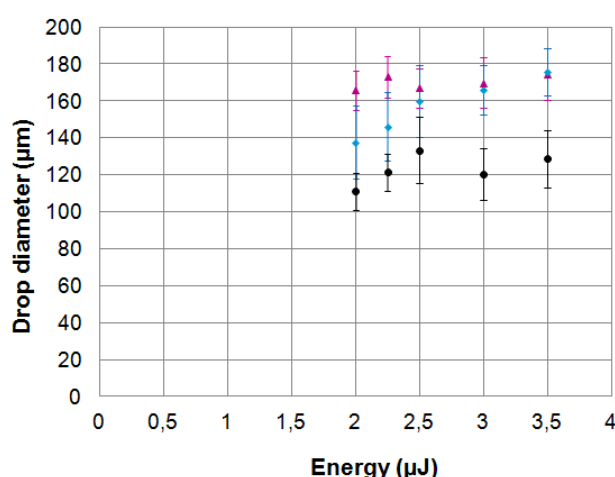


Figure 4. Printed drop diameter versus laser pulse energy.

(Pink ▲: bioink A, blue ◆: bioink B and black ●: bioink C)

### Influence of laser energy and bioink viscosity on the jet morphology

For the same laser illumination conditions as in Figure 4, the hydrodynamic behavior of bioinks A and B are represented in Figure 5, where we can see time resolved imaging of jet formation and emitted drops. Each picture of Figure 5 was taken 90 µs after the laser pulse arrival. The entire image height represents 1100 µm. From 1.75 to 3.5 µJ there was a jet formation for all bioinks and this jet tended to grow with increasing the laser energy.

We noticed that the jet formation at 1.75 µJ did not result in printed drop, according to Figure 4. Moreover, there were two similar behaviors for bioinks A and B: the jet broke off into one or several drops depending on laser energy. The number of drops raised in parallel with the laser energy. In addition, the jet height was roughly stable for bioinks A and B from 2.25 µJ to 3.5 µJ.

TRI experiments were conducted to determine the different LAB regimes in function of the laser energy and the type of bioink (Figure 5). Classically, three regimes are described in LAB process: sub-threshold regime, where no jet is produced, jetting regime, where a thin jet is formed, and plume regime where the bubble is bursting close to the bioink free surface and creates a liquid panache constituted of multiples drops [28,31]. From Figure 5, only two regimes have been identified: sub-threshold regime (at 1.5 µJ: bioinks A,B) and jetting regime (from 2 to 3.5µJ). No plume regime is observed in the TRI experiments of Figure 5 because the maximum energy of our set-up, namely

3.5  $\mu\text{J}$ , is not high enough to produce this regime. Finally, TRI images constitute a powerful diagnostic tool for understanding LAB regimes and the printing process.

The viscosity of the bioinks is an important parameter in the hydrodynamic of the jet resulting in printing [12,32]. As mentioned by [32], at low pulse energies, the viscosity might play a more important role on the jet behavior. Thus, the similar jet evolutions in function of energy in Figure 5 for bioinks A and B might be explained by their close viscosities (1.28 mPa.s for bioink A and 1.5 for bioink B).

Moreover, the Rayleigh–Plateau hydrodynamic instability [33] is responsible for the jet breaking off into drops. It is driven by the liquid surface tension, which aims to reduce surface energy of a system. As long as perturbations are growing along the jet neck, they will produce its break off into drops, a state where surface energy is well below those of the full jet [34].

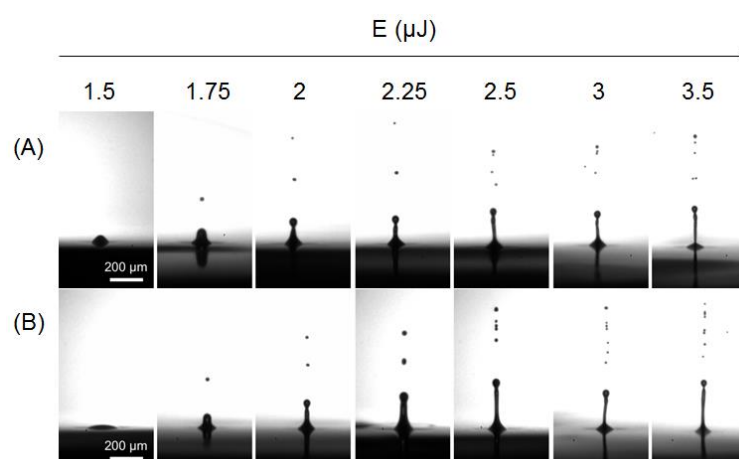


Figure 5. Time resolved imaging of the hydrodynamic interaction of the jet with laser, observed 90  $\mu\text{s}$  after the laser pulse arrival, as a function of laser energy. Results are presented for bioinks without cells: A and B.

### TRI investigation of the variation of the laser focus position

In order to determine practical parameter useful for the technical operator, we also studied the influence of the laser focusing longitudinal position on the jet height, in order to find a z-tolerancing enabling a reproducible printing. In addition, the purpose was to study how the focusing position influences the bioink jet behavior. The focus reference position used for all other experiments corresponded to a laser focusing on the gold layer (its thickness, 60 nm, was negligible compared to other layer thicknesses or the z step). This is represented in Figure 6.

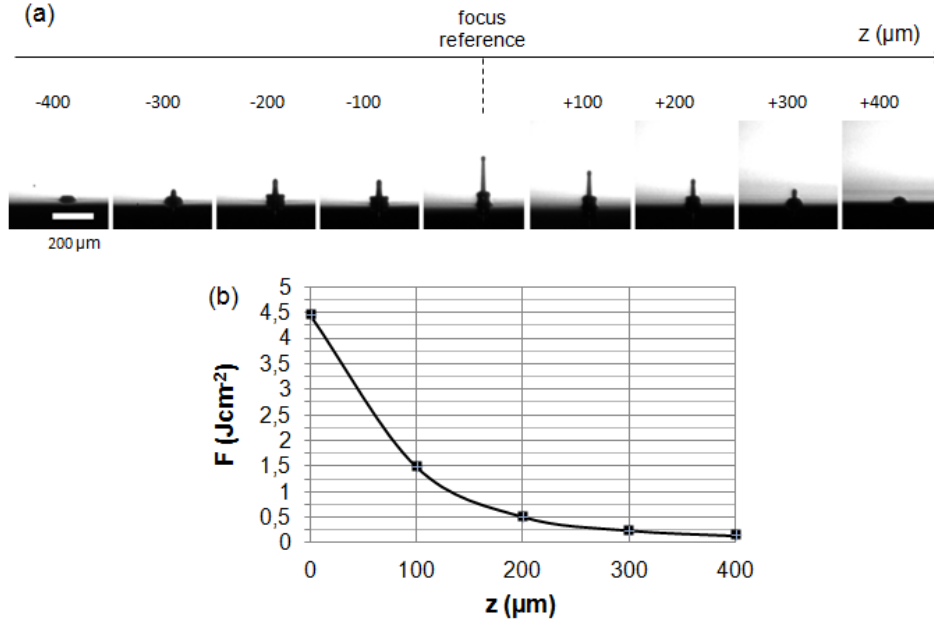


Figure 6. (a) Time resolved imaging of the jet formation, observed 20  $\mu\text{s}$  after the laser pulse arrival, when varying laser focus position, for bioink A. The laser pulse energy was 3.5  $\mu\text{J}$  corresponding to a laser fluence at the focus plane position of 4.5  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . (b) Fluence at the focus plane position when changing the focus position  $z$ .

We find that the maximum jet height was observed for the reference position given in Figure 6. This height was decreasing, as the focus position was moving away from the focus reference towards the glass substrate or the bioink free surface. We observed that the decrease in jet height is symmetric in both defocusing directions. Moreover, the jet was no longer present 300  $\mu\text{m}$  away from the focus reference in both directions: this position corresponded to a laser fluence of 0.25  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  on the gold layer.

We can draw several conclusions from the study of optimal laser focus position Figure 6. First, we confirmed that the ideal laser focus position creates a higher jet when laser pulse is tightly focused on the gold layer. Furthermore, the high symmetry of the jet images, from each sides of focus reference image (0 in Figure 6), reveals no presence of interfering phenomena for jetting generation. As a consequence, the images could be explained and correlated with the laser fluence calculated on the gold layer surface. For images from 0  $\mu\text{m}$  to 200  $\mu\text{m}$  defocalization distance, the gold surface is ablated as the ablation threshold, 0.5  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  [35] is below or equal to the fluences of the figure. Thus, for a defocalized laser pulse below or equal to 200  $\mu\text{m}$ , less fluence is relieved after the ablation of the gold layer to produce a jet. In this way, the jet high decreases in function of the defocalization distance because the fluence decreases on the gold layer. For a defocalized laser pulse higher than 200  $\mu\text{m}$ , the absence of jet formation can be explained by the calculated fluence, which is lower than the ablation threshold (Figure 6). Moreover, we can predict the range tolerance of the laser focus position, relatively to the  $z$  direction, thanks to the calculated fluences on the gold surface (Figure 6). Indeed, if we assume the laser fluence on the focus reference is 4.5  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  (maximum fluence condition in our setup), the maximum tolerance to print would be 60  $\mu\text{m}$  in order to print with a sufficient energy or fluence (2  $\mu\text{J}$  or 2.5  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  according to Figure 4). Indeed, 2.5  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  is corresponding to 60  $\mu\text{m}$  of  $z$  -tolerancing in Figure 6. The  $z$ -tolerancing of 60  $\mu\text{m}$  is higher than the depth of field (in air) of our optical system which is  $\pm 40$   $\mu\text{m}$ . In that way, the variation of laser focus position through the bioink, correlated with the plot of printed diameter in function of laser energy in Figure 4, are very useful to handle the LAB process on specific setups.

### Live/dead assays after printing

Finally, live/dead assays are presented in Figure 7. They were performed 24 h after printing of bioink C, containing keratinocyte cells, at two laser energies: 3 and 3.5  $\mu\text{J}$ . The population of live cell emits a green fluorescence whereas the dead-cell population produces a red fluorescence. We observed that almost all cells were alive after being printed at 3  $\mu\text{J}$  whereas some dead cells were present after the printing experiment at 3.5  $\mu\text{J}$ .

According to Figure 7 the optimal energy to print the cell-loaded bioink C is 3  $\mu\text{J}$ , as less dead cells are present for the experiment at 3  $\mu\text{J}$ . This conclusion is confirmed by the literature where it has been shown that high fluences could reduce cell viability (we recall that fluence increases notably with energy). This had been shown by Lin et al. [36], where human colon cancer cells viability decreases as the laser fluence increases and by Catros et al. [17], using endothelial cells.

For a similar process, i.e. in the infra-red with a gold absorbing layer, but using a 30 nanosecond laser, the required energies and fluences to produce a jet are about 21 to 33  $\mu\text{J}$ , corresponding to 3 and 7  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , including for mesenchymal stem cell printing [28] instead of 3 to 3.5  $\mu\text{J}$ , corresponding to 2.9 and 3.2  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , for keratinocyte cell printing in this study. The laser pulse energy and NA numbers were used to calculate laser fluence in [28]. These higher energies and fluences could reduce cell viability, as shown in [36] and [17]. In addition, the heat affected zone during gold ablation is reduced using femtosecond pulses compared to the nanosecond pulses: as the characteristic time of electron diffusion is in the order of 10 ps, for pulses shorter than 10 ps, the heat energy diffusion can be neglected in front of the pulse duration. The gold layer is ablated before heat diffusion could occur.

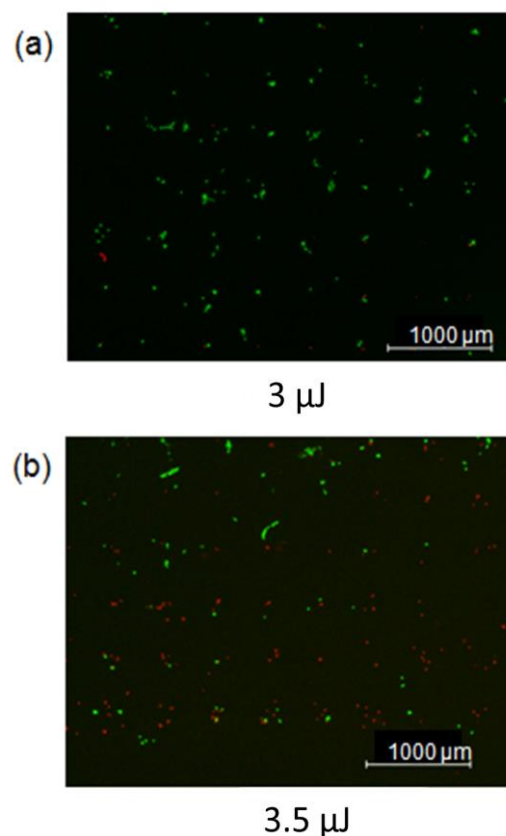


Figure 7. Live/dead assay 24 h after printing for the cell-loaded bioink C for 3 and 3.5  $\mu\text{J}$ .

## EXPERIMENTAL RESULTS IN THE CASE OF A HIGH ENERGY FEMTOSECOND LASER

In this case, the laser pulse energy is high enough to create jet and bubbles formation from the bioink without the use of a gold absorbing layer. In this section, we restraint the study to pulse energies of 8 and 10  $\mu\text{J}$ . These values were found to be able to deform the free surface of the bioink and create a liquid jet.

### Printed drop diameter as a function of numerical aperture

Measurements of printed drops diameters, versus numerical aperture of the focusing spot, are shown in **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, for laser pulse energy of 10  $\mu\text{J}$ . We can see that for numerical aperture ranging from 0.26 to 0.4, the mean value of the drops diameters is  $\sim 240 \text{ } \mu\text{m}$ . For numerical aperture of 0.7, the drops diameters values are much lower (64 to 146  $\mu\text{m}$ ), we attribute this fact to the amount of spherical aberration that has to be taken into account for such high numerical aperture. Indeed, for high numerical aperture such as  $\text{NA}=0.7$ , the spread off of the incident beam reduces the laser fluence that focuses on the free surface of the bioink.

In addition, an example of a printed drop is presented in Figure 8. The drop is quasi circular and the evaporation effect is observable thanks to the diffraction iridescence pattern on the drop. The drop diameter is 210  $\mu\text{m}$ .

Table 4 1 Influence of the numerical aperture on drop diameter for a pulse energy of 10  $\mu\text{J}$ .

Numerical Aperture (NA)	0.26	0.4	0.7
Printed drop diameter for bioink A ( $\mu\text{m}$ )	$210 \pm 11$	$277 \pm 23$	$146 \pm 22$
Printed drop diameter for bioink B ( $\mu\text{m}$ )	$249 \pm 42$	$231 \pm 41$	$64 \pm 12$

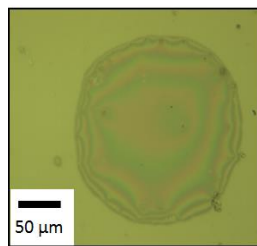


Figure 8. Example of printed drop of bioink A for a numerical aperture of 0.26 and a pulse energy of 10  $\mu\text{J}$ .

### Influence of numerical aperture and bioink viscosity on the maximum jet height

The maximum jet height, i.e. the maximum length of the jet before its break-up into drops, has been measured versus numerical aperture of the focusing spot, are shown in Table 4 2. We recall that the maximum values were extracted from 10 temporal measurements of the jet height from 10  $\mu$ s and up to 100  $\mu$ s.

The maximum jet height,  $h_{\max}$ , is strongly decreasing for the numerical aperture of 0.7 in the case of bioinks A and B. For bioink A, it is about 3 times smaller than  $h_{\max}$  for NA=0.4 and it is about 2 times smaller than  $h_{\max}$  for NA=0.26. For bioink B, it is about 4 times smaller than  $h_{\max}$  for NA=0.4 and it is about 5 times smaller than  $h_{\max}$  for NA=0.26.

Indeed, for high numerical aperture such as NA=0.7, the incident beam is spread off when propagating in the bioink (it is a liquid medium) which reduces the laser fluence focused on the free surface of the bioink. This might explain why lower jets height are observed for NA=0.7.

Table 4 2 Influence of the numerical aperture on the maximum jet height for a pulse energy of 10  $\mu$ J.

Numerical Aperture (NA)	0.26	0.4	0.7
$h_{\max}$ for bioink A ( $\mu$ m)	$660 \pm 100$	$1057 \pm 50$	$305 \pm 38$
$h_{\max}$ in bioink B ( $\mu$ m)	$1211 \pm 100$	$1053 \pm 22$	$241 \pm 24$

### **TRI investigation of the variation of the laser focus position with the influence of the numerical aperture (NA)**

Finally, as for the low energy set-up, we studied the influence of the laser focusing longitudinal position and of the numerical aperture on the printing process, in order to find a z-tolerancing for this set-up. Figure 9 shows TRI images of the bioink A when varying the laser focus position and for 3 numerical apertures of the focalization objective. The jet height increases and then decreases when moving the laser focalization. This indicates that there is a focus position where the jet height is maximum. In addition, the jet is lower and thinner for NA=0.7 compared to the others NA.

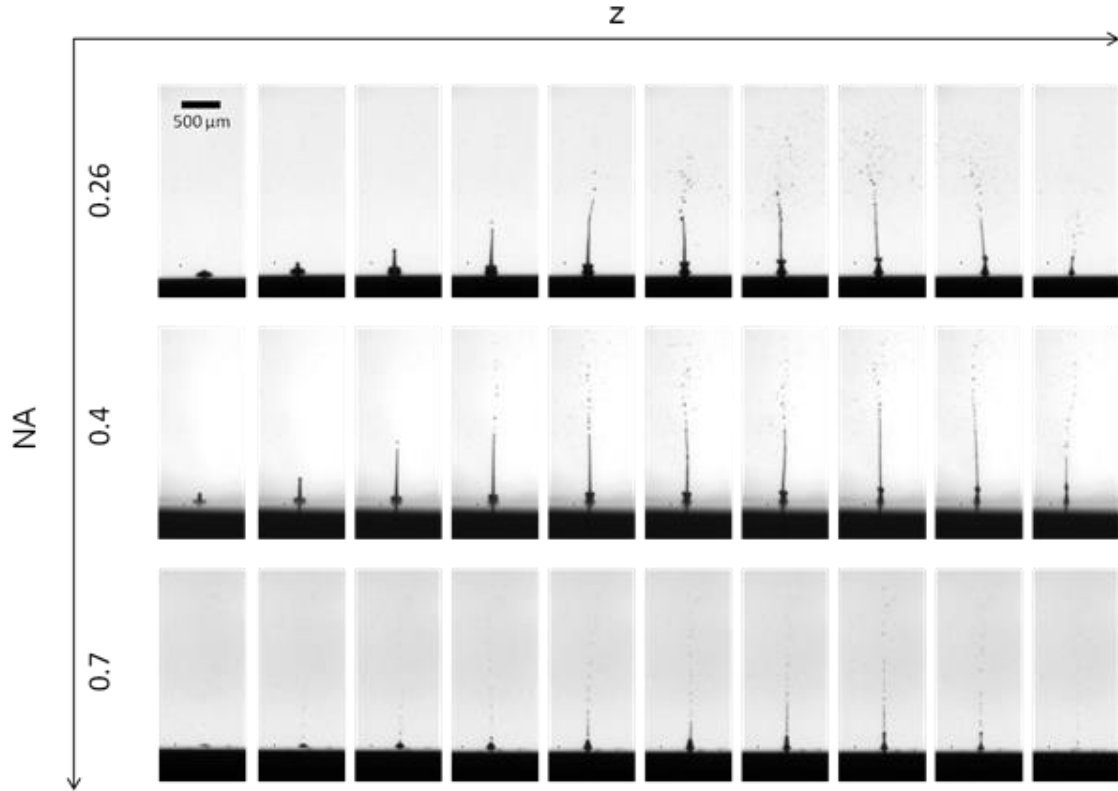


Figure 9. Time resolved imaging of the jet formation observed 30  $\mu\text{s}$  after the laser pulse arrival, when varying laser focus position for bioink A and for a pulse energy of 8  $\mu\text{J}$ .

From TRI images, we measured maximum jet heights  $h_{\text{max}}$ , depending on focus position  $z$ . We noticed a plateau of equals jet height values around  $h_{\text{max}} - 200 \mu\text{m}$  for the two bioinks. Thus, we looked for the  $z$  positions where the jet height  $h$  was higher or equals to  $h_{\text{max}} - 200 \mu\text{m}$ . Results are summarized in the next table, as a function of the numerical aperture. A mean range of  $\sim 40 \mu\text{m}$  for the focal spot location on the free surface of the bioink is required to produce a jet higher than  $h_{\text{max}} - 200 \mu\text{m}$  and thus to print drops with a transfer distance of  $h_{\text{max}} - 200 \mu\text{m}$ . The receiver position is thus tolerant (between  $h_{\text{max}}$  and  $h_{\text{max}} - 200 \mu\text{m}$ ) and it is in the range of classical standard off the shelf mechanical component. However, the tolerance on the focalization objective position for this process is much lower. It varies from 30 to 50  $\mu\text{m}$ , depending on the bioink and numerical aperture and for an energy of 8  $\mu\text{J}$ . In this way, the two determined tolerances constitute practical parameters for setting up the bioprinter.

Table 4 3. Z-tolerancing on laser spot location for printing conditions versus numerical aperture (pulse energy 8  $\mu\text{J}$ ).

Numerical Aperture (NA)	0.26	0.4	0.7
$\Delta z$ for bioink A ( $\mu\text{m}$ )	$30 \pm 10$	$40 \pm 10$	$50 \pm 10$
$\Delta z$ for bioink B ( $\mu\text{m}$ )	$30 \pm 10$	$40 \pm 10$	$50 \pm 10$



## CONCLUSION

In conclusion, two set-ups for laser assisted bioprinting were studied: a low energy set-up and a high energy set-up. With the low energy set-up an absorbing layer of gold was necessary to enable the bioprinting process and a 7  $\mu\text{L}$ -thin film of bioink was deposited on the donor. The high energy set-up was film-free (without an absorbing layer) and the bioink was in a reservoir containing a large volume up to 129  $\mu\text{L}$ .

For the low energy set-up, cell printing bioink was modeled with cell culture medium (bioink A) and then with a similar viscous model bioink (bioink B) which composition limited evaporation effects. Then, a cell bioink (bioink C) was used. Printed drop diameter, as a function of laser energy, was increasing with a quasi-linear tendency. Drops diameter were ranging from 110 to 170  $\mu\text{m}$  for energies between 2 and 3.5  $\mu\text{J}$ . Diameters for bioinks A and B were evolving similarly and it might be because of their similar viscosities. In addition, diameters for bioink C were lower of about 40  $\mu\text{m}$  than the other bioinks, for the same energy. Thus the model bioinks constitute a first approach of printing a cell bioink but they do not fit exactly with the printed drops of the cell bioink.

Moreover, the influence of laser energy and bioink viscosity on the jet morphology was observed by time resolved imaging. Only the jetting regime was observed and the two bioinks A and B were evolving similarly, due to their close viscosities.

In addition, variation of the laser focus position was investigated by TRI. A z tolerance enabling a reproducible printing with a transfer distance of 1 mm was found: it was of 60  $\mu\text{m}$  around the reference position given by the gold layer for a pulse energy of 3.5  $\mu\text{J}$ . This z tolerance is a practical parameter useful for the setting-up of a bioprinter.

Also, live/dead assays were performed 24h after the printing of the cell bioink C at 3  $\mu\text{J}$  and 3.5  $\mu\text{J}$ . The bioink C was composed of keratinocytes cells HaCaT which are skin cells. Results show that cell survival is higher for the lowest energy of 3  $\mu\text{J}$ . Thus, the lowest energy to print at a certain transfer distance is needed to better preserve cell viability after printing.

For the high energy set-up, printed drop diameter as a function of numerical aperture (NA) from 0.26 to 0.7 were investigated at 10  $\mu\text{J}$  for bioinks A and B. Drop diameters varied between 64 and 277  $\mu\text{m}$  depending on the laser experimental condition and they were lower for the highest NA of 0.7. A probable cause is the larger amount of aberrations in the case of NA=0.7 which diminishes the laser fluence.

What is more, the influence of numerical aperture (NA) and bioink viscosity on the maximum jet height was studied at 10  $\mu\text{J}$  for bioinks A and B. The maximum jet height  $h_{\text{max}}$  varied between 241 and 1211  $\mu\text{m}$  depending on the laser experimental condition and  $h_{\text{max}}$  was lower for the highest NA of 0.7. The effect of aberrations at this NA seem also a good explanation to the lower  $h_{\text{max}}$  for NA=0.7.

Also, the variation of the laser focus position with the influence of the numerical aperture (NA) was investigated by TRI at 8  $\mu\text{J}$  for bioinks A and B. When measuring jet height on TRI images, a plateau of similar jet values from  $h_{\text{max}}$  to  $h_{\text{max}} - 200$   $\mu\text{m}$  was observed, corresponding to a range of microscope position z. We found the receiver position is very tolerant (between  $h_{\text{max}}$  and  $h_{\text{max}} - 200$   $\mu\text{m}$ ) and the tolerance on the focalization objective position for this process is much lower (from 30 to 50  $\mu\text{m}$ ), depending on the bioink and numerical aperture and for an energy of 8  $\mu\text{J}$ . These two tolerances constitute practical parameters for setting up the bioprinter.

## REFERENCES

- [1] Guillotin B, Souquet A, Catros S, Duocastella M, Pippenger B, Bellance S, Bareille R, Rémy M, Bordenave L, Amédée J and Guillemot F 2010 Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization *Biomaterials* **31** 7250–6

- [2] Piqué A 2008 Digital Microfabrication by Laser Decal Transfer *J. Laser MicroNanoengineering* **3** 163–9
- [3] Zergioti I 2013 Laser Printing of Organic Electronics and Sensors *J. Laser MicroNanoengineering* **8** 30–4
- [4] Baum M, Kim H, Alexeev I, Piqué A and Schmidt M 2013 Generation of transparent conductive electrodes by laser consolidation of LIFT printed ITO nanoparticle layers *Appl. Phys. A* **111** 799–805
- [5] Duocastella M, Fernández-Pradas J M, Morenza J L and Serra P 2009 Time-resolved imaging of the laser forward transfer of liquids *J. Appl. Phys.* **106** 084907
- [6] Boutopoulos C, Tsouti V, Goustouridis D, Chatzandroulis S and Zergioti I 2008 Liquid phase direct laser printing of polymers for chemical sensing applications *Appl. Phys. Lett.* **93** 191109
- [7] Ludovic Rapp A K D 2009 Pulsed-laser printing of organic thin-film transistors *Appl. Phys. Lett.* **95** 171109–171109 – 3
- [8] Di Pietrantonio F, Benetti M, Cannatà D, Verona E, Palla-Papavlu A, Dinca V, Dinescu M, Mattle T and Lippert T 2012 Volatile toxic compound detection by surface acoustic wave sensor array coated with chemoselective polymers deposited by laser induced forward transfer: Application to sarin *Sens. Actuators B Chem.* **174** 158–67
- [9] Delaporte P, Ainsebaa A, Alloncle A-P, Benetti M, Boutopoulos C, Cannata D, Di Pietrantonio F, Dinca V, Dinescu M, Dutroncy J, Eason R, Feinaugle M, Fernández-Pradas J-M, Grisel A, Kaur K, Lehmann U, Lippert T, Loussert C, Makrygianni M, Manfredonia I, Mattle T, Morenza J-L, Nagel M, Nüesch F, Palla-Papavlu A, Rapp L, Rizvi N, Rodio G, Sanaur S, Serra P, Shaw-Stewart J, Sones C L, Verona E and Zergioti I 2013 Applications of laser printing for organic electronics ed X Xu, G Hennig, Y Nakata and S W Roth p 86070Z
- [10] Barron J A, Wu P, Ladouceur H D and Ringeisen B R 2004 Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns *Biomed. Microdevices* **6** 139–47
- [11] Patrascioiu A, Duocastella M, Fernández-Pradas J M, Morenza J L and Serra P 2011 Liquids microprinting through a novel film-free femtosecond laser based technique *Appl. Surf. Sci.* **257** 5190–4
- [12] Dinca V, Patrascioiu A, Fernández-Pradas J M, Morenza J L and Serra P 2012 Influence of solution properties in the laser forward transfer of liquids *Appl. Surf. Sci.* **258** 9379–84
- [13] Dinca V, Farsari M, Kafetzopoulos D, Popescu A, Dinescu M and Fotakis C 2008 Patterning parameters for biomolecules microarrays constructed with nanosecond and femtosecond UV lasers *Thin Solid Films* **516** 6504–11
- [14] Karaïskou A, Zergioti I, Fotakis C, Kapsetaki M and Kafetzopoulos D 2003 Microfabrication of biomaterials by the sub-ps laser-induced forward transfer process *Appl. Surf. Sci.* **208-209** 245–9
- [15] Colina M, Serra P, Fernández-Pradas J M, Sevilla L and Morenza J L 2005 DNA deposition through laser induced forward transfer *Biosens. Bioelectron.* **20** 1638–42
- [16] Ovsianikov A, Gruene M, Pflaum M, Koch L, Maiorana F, Wilhelmi M, Haverich A and Chichkov B 2010 Laser printing of cells into 3D scaffolds *Biofabrication* **2** 014104
- [17] Catros S, Guillotin B, Bacáková M, Fricain J-C and Guillemot F 2011 Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting *Appl. Surf. Sci.* **257** 5142–7
- [18] Barron J A, Krizman D B and Ringeisen B R 2005 Laser printing of single cells: statistical analysis, cell viability, and stress *Ann. Biomed. Eng.* **33** 121–30

- [19] Koch L, Kuhn S, Sorg H, Gruene M, Schlie S, Gaebel R, Polchow B, Reimers K, Stoelting S, Ma N and others 2009 Laser printing of skin cells and human stem cells *Tissue Eng. Part C Methods* **16** 847–54
- [20] Hopp B, Smausz T, Antal Z, Kresz N, Bor Z and Chrisey D 2004 Absorbing film assisted laser induced forward transfer of fungi (*Trichoderma conidia*) *J. Appl. Phys.* **96** 3478
- [21] Doraiswamy A, Narayan R J, Lippert T, Urech L, Wokaun A, Nagel M, Hopp B, Dinescu M, Modi R, Auyeung R C Y and Chrisey D B 2006 Excimer laser forward transfer of mammalian cells using a novel triazene absorbing layer *Appl. Surf. Sci.* **252** 4743–7
- [22] Guillemot F, Souquet A, Catros S, Guillotin B, Lopez J, Faucon M, Pippenger B, Bareille R, Rémy M, Bellance S, Chabassier P, Fricain J C and Amédée J 2010 High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering *Acta Biomater.* **6** 2494–500
- [23] Arnold C B, Serra P and Piqué A 2007 Laser Direct-Write Techniques for Printing of Complex Materials *MRS Bull.* **32**
- [24] Ozbolat I T and Yin Yu 2013 Bioprinting Toward Organ Fabrication: Challenges and Future Trends *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **60** 691–9
- [25] Lin Y, Huang G, Huang Y, Tzeng T-R J and Chrisey D 2010 Effect of laser fluence in laser assisted direct writing of human colon cancer cell *Rapid Prototyp. J.* **16** 202–8
- [26] Lin Y, Huang Y, Wang G, Tzeng T-R J and Chrisey D B 2009 Effect of laser fluence on yeast cell viability in laser-assisted cell transfer *J. Appl. Phys.* **106** 043106
- [27] Duocastella M, Fernández-Pradas J M, Morenza J L, Zafra D and Serra P 2010 Novel laser printing technique for miniaturized biosensors preparation *Sens. Actuators B Chem.* **145** 596–600
- [28] Patrascioiu A, Fernández-Pradas J M, Morenza J L and Serra P 2012 Microdroplet deposition through a film-free laser forward printing technique *Appl. Surf. Sci.* **258** 9412–6
- [29] Colina M, Duocastella M, Fernández-Pradas J M, Serra P and Morenza J L 2006 Laser-induced forward transfer of liquids: Study of the droplet ejection process *J. Appl. Phys.* **99** 084909
- [30] Brown M S, Kattamis N T and Arnold C B 2011 Time-resolved dynamics of laser-induced micro-jets from thin liquid films *Microfluid. Nanofluidics* **11** 199–207
- [31] Dinca V, Ranella A, Farsari M, Kafetzopoulos D, Dinescu M, Popescu A and Fotakis C 2008 Quantification of the activity of biomolecules in microarrays obtained by direct laser transfer *Biomed. Microdevices* **10** 719–25
- [32] Souquet A 2011 *Etude des processus physiques mis en jeu lors de la microimpression d'éléments biologiques assistée par laser* (Bordeaux 1)
- [33] Muhammad A, Pages E, Ducom A, Fontaine A and Guillemot F 2014 Controlling laser-induced jet formation for bioprinting mesenchymal stem cells with high viability and high resolution *Biofabrication* **6** 045001
- [34] Lin Y, Huang Y and Chrisey D B 2011 Metallic Foil-Assisted Laser Cell Printing *J. Biomech. Eng.* **133** 025001
- [35] Smausz T, Hopp B, Kecskeméti G and Bor Z 2006 Study on metal microparticle content of the material transferred with Absorbing Film Assisted Laser Induced Forward Transfer when using silver absorbing layer *Appl. Surf. Sci.* **252** 4738–42

[36] Papageorgiou I, Brown C, Schins R, Singh S, Newson R, Davis S, Fisher J, Ingham E and Case C P 2007 The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts in vitro *Biomaterials* **28** 2946–58

# FABRICATION OF FRESNEL ZONE PLATE AND PHASE MASK BY INDEX CHANGE IN THE BULK OF POLYMERS WITH FEMTOSECOND LASER PULSES

M603

H. Desrus<sup>1</sup>, C. Poulin<sup>1</sup>, V. Germes<sup>1</sup>, B. Chassagne<sup>1</sup>, S. Hocquet<sup>2</sup>, Q. Maouhoub<sup>1</sup>, A. Morisset<sup>1</sup>, R. Kling<sup>1</sup>, F. Deloison<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ALPHANOV, rue François Mitterrand, 33400 Talence, France

<sup>2</sup> GREENFIELD TECHNOLOGY, 1 bis rue Marcel Paul, 91300 Massy, France

## Abstract

In recent years, direct writing in the volume of transparent materials using femtosecond pulses has been growing considerably. Applications are wide, namely from holography purposes to the design of optical waveguides or multifocal lenses for optical corrections in micromachining [ 1]. It is known that permanent modification in the refractive index of the material can be created by tightly focused femtosecond pulses, as a consequence of non linear absorption within the focal volume [ 2].

In our study, we modified permanently the refractive index in the bulk of a transparent polymer in the visible spectrum. We investigate the range of index change in dependence of laser parameters. Preventing crack apparition or too low index change, we varied notably pulse energy (in the order of 0.2  $\mu$ J), spot size (from 2 to 4  $\mu$ m) on target and laser pulse overlap. For some of the created microstructures, namely the phase masks or diffraction gratings, we evaluated diffraction efficiency on diffraction patterns by power measurements. Indeed, the power ratio of the first order over the zero order of diffraction allows for determining this efficiency.

The process uses a Satsuma (Amplitude Systemes) amplified fiber laser that delivers 400 femtosecond pulses (5W@2MHz). Thanks to a frequency conversion to a 515 nm wavelength the spot size can be even reduced and multiphotonic absorption efficiency can be increased. This setup allows for design and laser production of multifocal lenses (optical diffractive phase zone plate). In addition, to illustrate the possibilities of our phase masks, we machined patterns which project logos after

illumination with coherent light. The machining conditions of these two realizations are very robust.

## Introduction

Intraocular lenses are used in eye surgery to provide a full visual acuity over the whole range from distance to near. To achieve this full visual acuity, a multifocal IOL (intraocular lens) could be used to provide the best possible vision. As femtosecond pulses are a good way to change the refractive index of a material [ 2], this kind of laser would perfectly fit the need of the possibility to engrave a transparent material, or permanently modify the index of refraction of the material.

This paper will treat about the possibility to engrave a phase mask or a phase zone plate in a transparent material, so we can create holographs or focus light as well. The first part of this paper will talk about phase mask engraving in a polymer with a refractive index of 1.55, and the second part will talk about the engraving of Soret phase zone plate in polymer and in IOL.

## Experimental

### Set up & laser source

We used an amplified fiber laser (Satsuma, Amplitude Systemes) generating a laser wavelength of 1030nm with pulse duration of 400fs, a pulse energy up to 10 $\mu$ J (5W@500kHz) and providing a repetition rate range between 1kHz & 2MHz. A 515 nm frequency conversion allows us to work with even lower spot diameters at focus position. The fs pulses are focalized into the bulk (from 100 $\mu$ m depth to 1mm) of our samples with an optical microscope objective.

The workstation is made of an inverted microscope (Eclipse Ti, Nikon) and of controlled X-Y-Z translational stages (A3200 controller, Aerotech; ANT130-XY stages, Aerotech) of displacement precision down to few nm and a speed up to 350 mm/s. Samples are displaced during the laser micromachining experiments thanks to these stages whereas the laser beam is fixed through the focalization objective.

The focalization parameters for the two index change realizations are resumed in the following table:

Process	Objective	Numerical aperture	$\emptyset$ , beam diameter* ( $\mu\text{m}$ )
Phase masks	100x	0.5	1.3
Fresnel zone plates	10x	0.26	2.4

\*The beam diameter is calculated at focus position with Airy's radius formula in the air

A camera that collects the light passing through the machining objective allows the observation of the matter modification, thanks to a contrast variation, during the laser inscription of the different patterns into the bulk.

## Phase masks into polymer

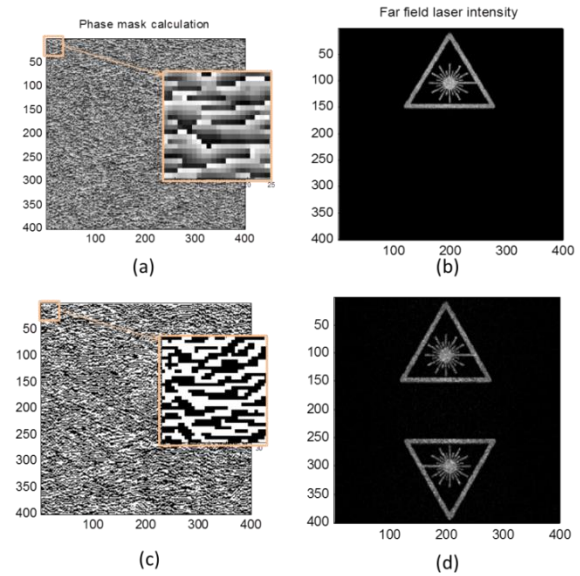
### Material & Method

#### Mask Calculation

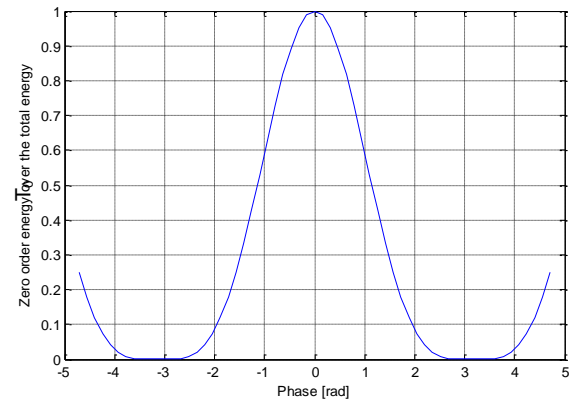
Far field calculation from a diffraction mask uniformly illuminated by a coherent laser source is simply the Fourier transform (FT) of the field transmitted by the phase mask [ 3]. Any shape observed far enough from the diffraction mask can be created if one is able to code its Fourier transform onto a transmission plate in both phase and amplitude. Our process only changes the index of the material which means that only the spatial phase is modified. Gershberg-Saxton (GS) algorithm is a classic way to code a phase mask with a FT close enough to the goal image shape [ 4]. A 400x400 numerical example is presented Figure 1(a,b).

Accessible phase change is limited; in first tests we consider only two states: laser on or off. So there are only two different phases. Figure 1(c and d) shows numerical calculation with 0 (no laser) and  $\pi$  (ideal

index change): the image is conserved but a symmetrical ghost is present. With a lower value of phase, the images are still visible but most of the energy is not diffracted (the “zero order” is preponderant). In figure 2, we calculated the zero order energy relative to the phase shift.



**Figure 1 : (a) Numerical phase mask calculated by GS algorithm, (b) Far-field calculation by Fourier transform, (c) binarization of the phase mask, (d) resulting far-field intensity – the result is close to the target image by a ghost image is present.**



**Figure 2 : Energy in the zero diffractive order regarding the phase shift induces by the laser.**

#### Micromachining process

The calculated phase masks were inscribed into the polymer bulk by focalization of the laser beam with an objective of high numerical aperture (0.5) at a depth of 1 mm under the free surface. The beam diameter at focus point in the polymer of 1.55

refractive optical index was roughly  $1.5 \mu\text{m}$  according to the Airy's radius formula. To realize each phase mask, each black pixel has been micromachined with a specific number of pulses i.e. one or several (from 1 to 4). The same number of pulses was used for the whole mask or the whole plane of a phase mask. The number of pulses per pixel has been varied by changing the stages displacement speed and the laser repetition rate according to the formula:  $\text{No. pulses} = \frac{\phi \times f}{v}$

with

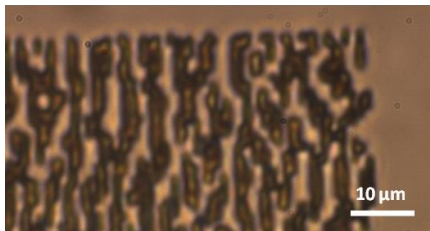
$\phi$ , beam diameter at focus position

f, laser repetition rate

v, stages speed

A system associated with the stages, named PSO for Position Synchronized Output, makes the laser fire according to the stages position corresponding to the pattern we want to inscribe into the bulk. So the speed of the motors remains constant all along a line.

The machining quality was checked by camera observation during the process. Below is an example of a mask part observed into the bulk by this system.



**Figure 3: Part of a mask inscribed by laser into the bulk of a polymer. 15 pulses - 0.5 NA – 6 kHz –  $4 \text{ mm.s}^{-1}$  – 1 mm depth –  $10.8 \text{ J.cm}^{-2}$**

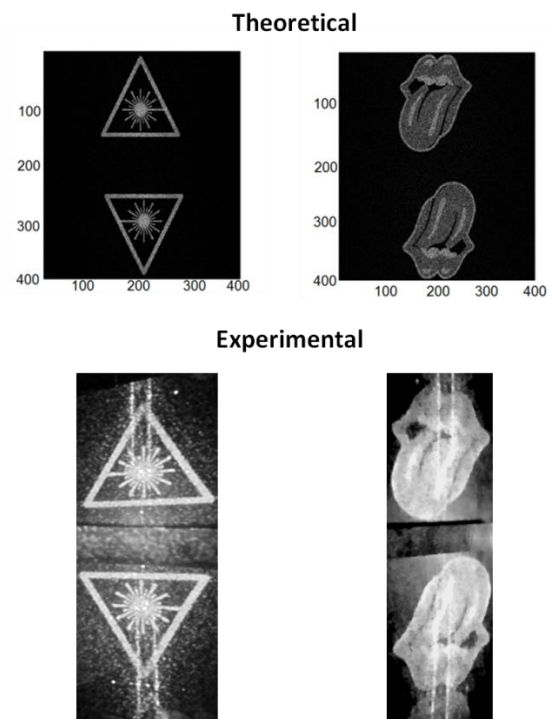
### Samples characterization

We designed two phase masks to qualify the resolution on the diffractive patterns for high spatial frequencies (see laser danger (b) Figure 4 for high frequencies). The Rolling Stones mouth logo® is interesting because of its 3 intensity levels instead of two as with laser danger diffraction pattern (see rolling stones mouth (c) Figure 4). In order to determine the phase change induced by our phase mask we illuminated the phase masks with a HeNe laser (633 nm) and we made power measurements with a power sensor from Thorlabs (PM 120 VA).

Indeed, we picked up  $P_{\text{transmitted}}$  - the power transmitted after a mask with a powermeter head as close as possible to the sample, to collect the power from all the diffraction orders – and  $P_0$  – the power of the incident light behind the mask of the zero order at a fixed distance (50 cm). The ratio  $P_0$  over  $P_{\text{transmitted}}$  gives the percentage of the power in the zero order,  $T_0$ . From this, we deduced, thanks to **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, the phase change induced by a mask. We obtained typical phase values of  $\pi/8$ .

### Machining process influence on the diffraction pattern

We varied our machining parameters to realize the phase masks with an optimal quality (in terms of phase change, process speed or reliability to the theoretical calculated mask for instance). The machining parameters we changed are the followings: laser repetition rate, stage speed, laser fluence and machining depth. We made the two types of phase masks generating diffractive patterns conform to the calculations. Theoretical calculations for the diffractive patterns in the far field are represented below, on the top of Figure 4 whereas the experimental results are showed on the low part of Figure 4.



**Figure 4 : (Up) Calculated far-field intensity for laser & Rolling Stones® logos. (Down)**

**Corresponding diffraction patterns observed after a HeNe laser illumination of the phase masks. Bottom images contrast has been optimized & the zero order has been hidden to get a better precision of details on the patterns.**

The two logos are well recognizable and the quality of the detail on these patterns highlights the efficiency of the method to obtain high spatial frequencies as in the danger laser logo or lower as in the Rolling Stones mouth logo®. One can see that the 3 intensity levels in the Rolling Stones mouth logo® are well obtained experimentally as in the initial logo for a reasonable process time (< 20 min). Compared with the theoretical masks, we note the presence of aliasing and also two straight lines due to micromachining errors. The characteristic operating parameters are presented in Table 1.

Repetition rate (kHz)	Stages speed (mm.s <sup>-1</sup> )	Fluence (J.cm <sup>-2</sup> )	Machining depth (mm)	Number of pulses
1	1	10.8	1	1
Objective's NA	Machining wavelength (nm)	Mask size	Estimated experimental phase shift (rad)	Machining time (min)
0.5	515	400x400 μm <sup>2</sup>	π/10	20

**Table 1 : Parameters for diffractive patterns of Figure 4.**

#### *Robustness of process:*

We verified that some parameters are not influent on the induced index change into the polymer to determine which variables are relevant to change to optimize the process.

By several power measurements (5 times the same measure, cf Samples characterization paragraph), we estimated the uncertainty of  $T_0$ , the transmitted percentage of power in the zero order, to be 3 %. This uncertainty is due to the powermeter itself (0.25 mW in the documentation given by the supplier; we divided this value by our typical power measurements, that is to say 12 mW, this leads to 2 % of uncertainty) and to the uncertainty of the measure (alignment, manipulation of the sample etc...). Then the uncertainty impacting the phase change is

evaluated by using Figure 2 and the uncertainty of  $T_0$ . Considering the region of interest on this plot, i.e. for  $0.8 > T_0$  values  $> 0.9$ , the curve can be approximated by a straight line whose slope is 0.33 ( $T_0 = 0.33 \Phi$  or  $\Phi = 3 T_0$ , see Table 1). Thus the phase change uncertainty is evaluated at 3x3 to be 9 %.

Moreover, we repeated the same trial with the two different types of phase masks, such as sign of danger laser & Rolling stones mouth (cf parameters in **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). We observed a difference of 11% between the phase change values (i.e.  $1 - \Phi_1 / \Phi_2$ ). This result is coherent with the uncertainty of 9% previously determined. Thus, we considered from this result there is no significant influence of the type of mask on the phase change measurements.

Repetition rate (kHz)	Stages speed (mm.s <sup>-1</sup> )	Fluence (J.cm <sup>-2</sup> )	Machining depth (mm)	Number of pulses*
1	1	10.8	1	1

\*calculated with the formula of the *Micromachining process* paragraph

**Table 2 : Parameters of a repeated phase mask trial.**

Then, we checked that repeating the same trial with the same number of pulses with two different repetition rates and speeds were not influencing the phase change of the mask (see former law giving the number of pulses per pixel). The relevant parameter we should consider for the trials is thus the pulse number instead of speed and laser repetition rate, regarding the range of frequencies we explored (from 1 to 500 kHz).

With the previous consideration we repeated our tests 3 times. Nevertheless, a higher number of repetitions of the same trial would be necessary to qualify precisely the influence of each parameter. The given values provide just an idea of the low influence of these parameters on the phase change as the number of repetitions of the trial was small.

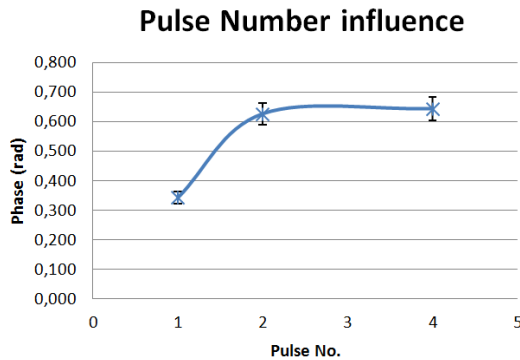
#### *Pulse Number versus phase change:*

We observed the effect of pulse number on the phase mask on Figure 5. As expected, when we increased



the number of pulses for a given fluence of 10.8 J.cm<sup>-2</sup> the phase change induced by the phase mask increases. Nevertheless, it seems to be a plateau from 2 to 4 pulses. Some complementary trials would be necessary to confirm this tendency that the index change process appears not to be anymore efficient for a number of pulses greater than 2.

To determine the error bar on the plot Figure 5, we used the previously determined uncertainty of 9 % over the phase change values.



**Figure 5 : Phase change versus Pulse Number for phase masks at 10.8 J.cm<sup>-2</sup>.**

### Phase zone plates into transparent materials

#### Material & Method

##### *Phase zone plate's radius calculation*

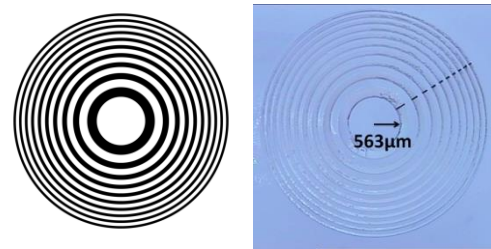
We also fabricated phase zone plate (compared with Fresnel zone plate, these opaque rings are replaced with transparent rings with a constant phase change  $\Phi$  [ 5]) by femtosecond laser writing [2] in order to realize multifocal lenses for intra-ocular implant correction. Usually, those lenses are made of a carrier lens which determines the power for the far vision of the bifocal, whereas the diffractive profile provides the added power used to correct the near vision [ 6]. In this study we consider only planar lenses in order to focus on the addition of power and the multi-focality provided by the diffractive profile. A power addition of + 2D which corresponds to a focal length  $f$  of 500 mm is obtained when the radii  $R_n$  of the annular concentric zones is given by  $R_n^2 = n \times \lambda \times f$ , where the integer  $n$  indicates the  $n$ th Fresnel zone and  $\lambda$  is the operating wavelength. The working principle of the phase zone plate relies on the fact that the diffraction of light from alternating zones interferes constructively at the designed focal point.

Following figures show theoretical diffraction results calculated by fast fourier transform code. Unlike a standard lens the phase zone plate produces intensity maxima along the propagation axis of the plate at odd fractions ( $z = f/3$ ,  $z = f/5$ , etc.). Although these contain less energy than the principal focus at the  $z = f$  location (because it is wider due to its higher numerical aperture), they have the same maximum intensity [ 5].

Location of the focus points is independent of  $\Phi$ . At the focus the intensity  $I$  is  $\propto [1-\cos(\Phi)]$ , giving maximum intensity when  $\Phi = \pi$  and zero when  $\Phi = 0$ .

#### *Micromachining process*

The experimental process of machining relies on spirals displacements of the stages to achieve the Soret zone plates patterns at a defined depth. Each ring is inscribed into the bulk, thanks to successive spirals. The maximum radius of each spiral is incremented of a 2  $\mu\text{m}$  step from the minimum radius until the maximum radius of the considered ring. The spiral process is well suited for our application because it minimizes the travel time of the stages for the Soret patterns of circular geometry, and thus the total time of the micromachining. In our experiments, we cumulated the phase index change induced by a zone plate by machining several identical zone plates on the top of each other (cf volume Fresnel zone plate [2]). Each plane containing a Soret zone plate was separated from another plane by a defined depth into the bulk of the material. Following figures show the Soret zone plate and an example of its inscription into the bulk of the polymer:

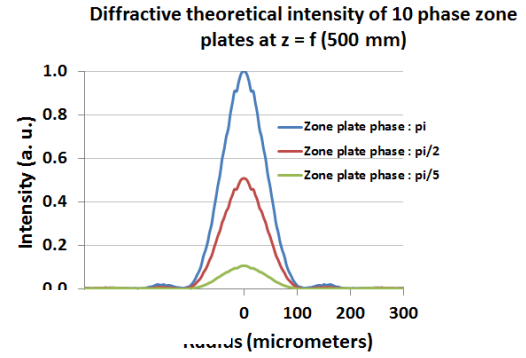
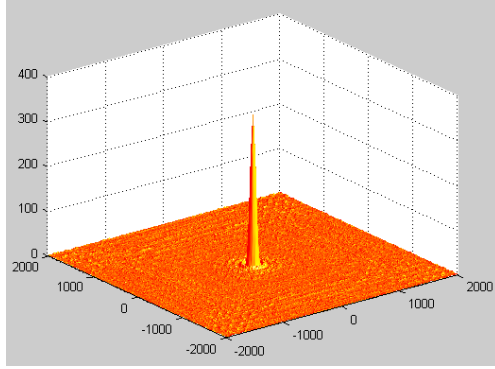


**Figure 6 : Soret zone plate pattern for 10 rings (right) and the inscription into the bulk (left). Observation was made with a binocular microscope. The black dashed line is due to the machining process. Parameters: 50  $\mu\text{m}$  of depth**

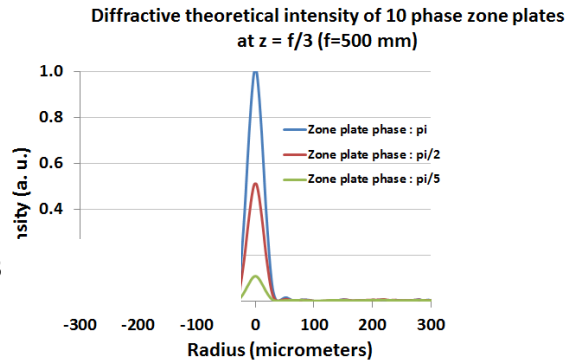
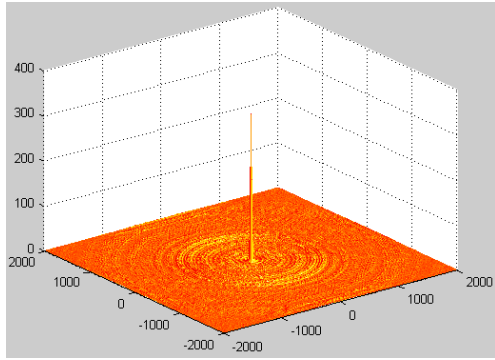
**between planes – 6 planes - 0.26 NA – 1 kHz – 0.5 mm.s<sup>-1</sup> – 1 mm depth – 7.6 J.cm<sup>-2</sup>**

As each spiral begins and ends at the same location ( $\pm 2\mu\text{m}$ ) and as there is a time laps during which the laser stops/lights after/before the end/beginning of stages displacement an over-illuminated region appears on our patterns (cf the black dashed line on the previous figure, at the right).

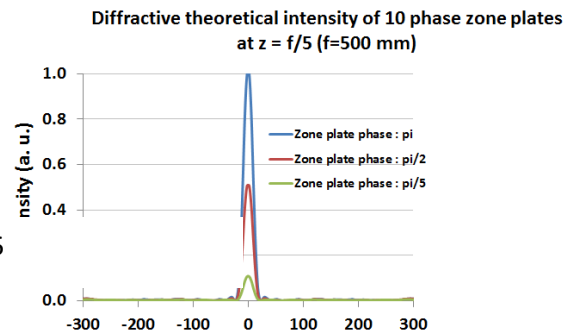
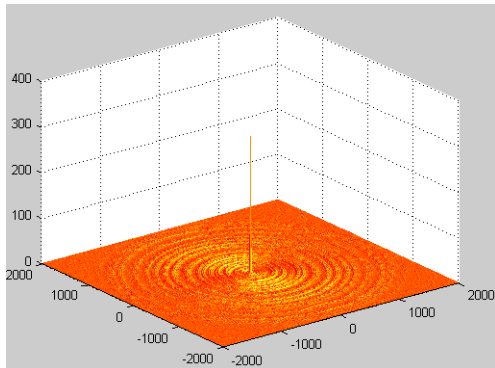
This defaults can be corrected by PSO uses (Position synchronized Output i.e. synchronization of stages position with the laser fire). We have been testing a solution employing the PSO with Soret patterns where stages were moving linearly. This removes the over-illuminated area, nevertheless the machining time was much too long to be used during this study.



a)  $z = f$



b)  $z = f/3$



c)  $z = f/5$

Figure 7 : (Left) 2D Intensity plot ( $\Phi = \pi$ ) at various longitudinal focus location. (Right) Corresponding diffractive theoretical cross section intensity of a Soret zone plate with 10 rings at  $f$  (a),  $f/3$  (b) and  $f/5$  (c), with  $f$ , the focus position.

In the future, we have to try a different way of programming stages displacement with PSO: that is to say with a rotational movement. This requires a minimum of development time, notably with programming that will be taken in a new study.

## Samples characterization

We characterised Soret zone plates by illuminating them with a HeNe laser source (633 nm wavelength) and by measuring the focus positions with a camera (TaperCamD-UCD23- DataRay Inc.).

## Results

We made numerous laser micromachined Soret zone plates by varying parameters (see Table 3) in order to optimize the process and the resulting multifocal lenses. Notably, we machined into the bulk several zone plates on top of each other in order to cumulate the phase index change [2]. We still kept the radii of the zone plate being calculated for a focus position at 500 mm. What is more, we designed these zone plates in different materials: in a polymer transparent to visible wavelengths and in intraocular implants in order to realize intraocular lenses (IOL) implants.

Repetition rate (kHz)	Stages speed (mm.s <sup>-1</sup> )	Fluence* (J.cm <sup>-2</sup> )	Machining depth (mm)	Number of pulses*
No. of planes	Interplanes distance (μm)		No. of micromachined rings in the pattern	

\*on target

**Table 3 : Varying parameters for Soret zone plate.**

### Transparent polymer

This polymer has a 1.55 refractive index and its composition is confidential. For the following exposed trials, the mask was composed of 10 engraved rings spaced of 30 μm into the bulk at 1 mm depth and a fluence of 8.2 J/cm<sup>2</sup>.

At an engraving speed of 20 mm/s and with 6 planes, we changed the laser repetition rate, that is to say the overlap between laser pulses, to evaluate its influence

on the designed zone plates. For a 10 kHz process, we observed an experimental focal point at 520 mm (f) from the sample. At 1 kHz, the observed focus positions are at 520 mm (f) and 195 mm (f/3). Even if we do not observe the f/5 focus point, experimental results agree with the former theory.

We note that there is a shift of 20 mm between the focal point we were expecting from radii calculation and experiments. We can attribute this to mismatch between the pattern we want to engrave and the real one. This can be due to inaccuracies in the real spot size at focus location during machining into the bulk or in the index changed area for each engraved ring, etc... Apparently, the process at the lowest frequency (1 kHz), that is to say a higher overlap between laser pulses, seems to fit better with our application.

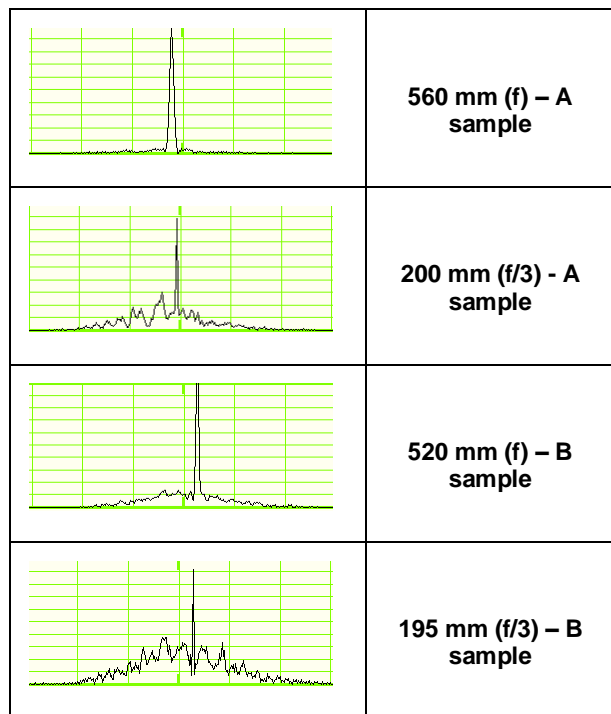
If we keep constant the overlap between the pulses (ratio between frequency and stages speed; 10 kHz & 20 mm/s; 1 kHz & 2 mm/s), then we change the number of planes, that is to say the total cumulated phase shift, we are able to qualify its effect on the focal lengths.

A decrease of 15 % in the phase modification (by engraving 5 planes in the volume phase zone plate instead of 6) seems to imply better diffractive results at the z=f/3 location. Indeed, this focus location is only observed for the 5 planes in the volume phase mask. We think one reason for this result is that the phase change generated by the 6 planes volume phase mask is bigger than  $\pi$ .

What is more interesting, we found out two different experimental working conditions able to design bifocal components (f & f/3).

N°	Rep rate (kHz)	Stages speed (mm/s)	No. Of planes	Interplanes distance (μm)	Focus locations (mm)
A	1	2	5	30	200 (f/3)
					560 (f)
B	1	20	6	30	195 (f/3)
					520 (f)

**Table 4 : Experimental working conditions able to design bifocal components (f & f/3) for a 10 engraved rings zone plate at 8.2 J.cm<sup>-2</sup>.**



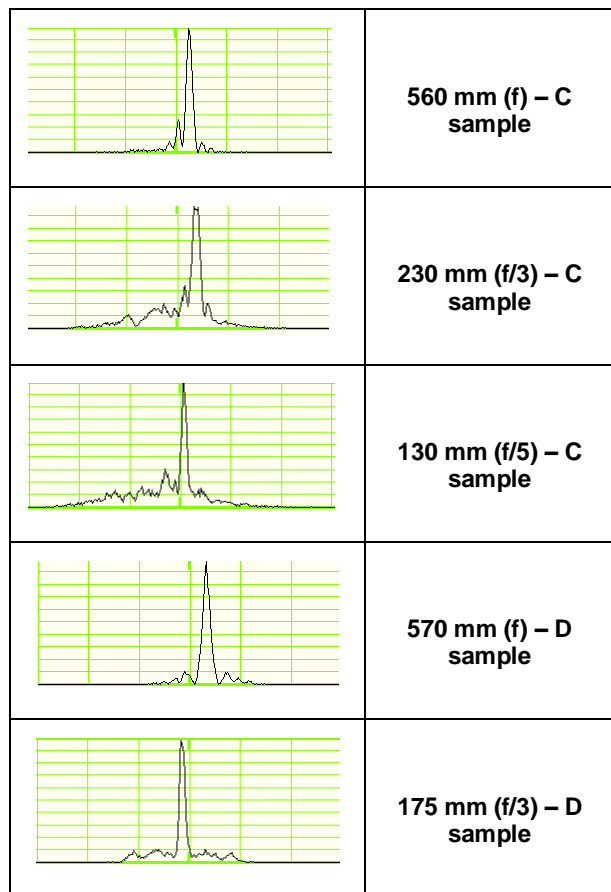
**Table 5 : Experimental diffractive cross section intensity of phase zone plate with 10 rings at f & f/3 corresponding to parameters of Table 4.**

#### *Intraocular implants*

We also succeed in the realization of phase zone plates in non hydrated hydrophilic intraocular commercial implants with the followings parameters and experimental results:

N°	Stages speed (mm/s)	No. of rings	No. of planes	Interplanes distance (μm)	Focus locations (mm)
C	2	5	5	30	130 (f/5)
					230 (f/3)
					560 (f)
D	2	10	2	30	190 (f/3)
					570 (f)

**Table 6 : Experimental working conditions able to design multifocal component (f/5, f/3 & f) at 4.2 J.cm<sup>-2</sup> and 1 kHz and at 200 μm depth in the bulk.**



**Table 7 : Experimental diffractive cross section intensity of phase zone plate at f, f/3 & f/5 corresponding to parameters of Table 6.**

#### **Conclusion**

We showed it is possible to engrave a phase mask or a phase zone plate in a transparent material and a commercial intraocular implant with a femtosecond laser. We described in detail the experimental machining processes. We found out different working conditions able to realize multifocal optical components thanks to phase index change into the bulk. This work could be helpful in the field of ophthalmology.

#### **Acknowledgements**

We acknowledge the Aquitaine Regional Council for support and funding.

### References

- [ 1] T. Tamaki, W. Watanabe and H. Nagai, (2006) Opt. Express, Vol. 14, N. 15, 6971
- [ 2] P. Srisungsitthisunti, O. K. Ersoy and Xi. Xu, (2007) J. Opt. Soc. Am. B, Vol. 24, N. 9, 2090-2096
- [ 3] M Born et E. Wolf, (1964) Principles of Optics, Cambridge Univ. Press, 2nde édition
- [ 4] R. W. Gerchberg and W. O. Saxton, (1972) Optik 35, 237
- [ 5] A. R. Jones, (1969) Brit. J. Appl. Phys, Ser. 2, Vol. 2, 1789-1791
- [ 6] F. Castignoles, M. Flury and T. Lepine, (2010) Opt. Express, Vol. 18, N. 5., 5245

### Meet the Author(s)

Helene Desrus joined Alphanov in April 2012 working as a PhD student on laser micromachining. She is graduated from Engineering School of Orleans (France) in 2012. Her expertise lies in modification of transparent materials with ultrafast lasers for medical and optical applications. Her doctoral thesis concerns femtosecond laser assisted bioprinting for tissue engineering.

# Laser-Assisted Bioprinting for Tissue Engineering

Olivia Kérourédan<sup>1,2</sup>, Hélène Desrus<sup>2,3</sup>, Murielle Rémy<sup>1,2</sup>, Jérôme Kalisky<sup>1,2</sup>, Jean-Michel Bourget<sup>2</sup>, Joëlle Amédée-Vilamitjana<sup>2</sup>, Jean-Christophe Fricain<sup>1,2</sup>, Sylvain Catros<sup>1,2</sup>, Raphaël Devillard<sup>1,2,3</sup>

1. Univ. Bordeaux, Bioingénierie Tissulaire, U1026, F-33000 Bordeaux, France

2. INSERM, Bioingénierie Tissulaire, U1026, F-33000 Bordeaux, France

3. Alphanov, F-33400 Talence, France

<b>1. Laser-Induced Forward Transfer for Laser-Assisted Bioprinting .....</b>	<b>227</b>
1.1. The history of Laser-Induced Forward Transfer .....	227
1.2. General and physical principles involved in Laser-Induced Forward Transfer technologies .....	229
1.3. Material and Methods for Laser-Assisted Bioprinting .....	230
<b>2. Applications of LAB for tissue engineering .....</b>	<b>232</b>
1.1. Contribution of LAB in biofabrication and tissue engineering .....	232
1.2. Bioprinting of biomaterials and cells .....	234
1.3. Bioprinting of other biological elements, DNA and Peptides.....	237
1.4. Intake of LAB in Three-dimensional printing strategies .....	238
1.5. In vivo bioprinting .....	239
1.6. Example of LAB application for bone tissue engineering .....	241
1.1.1. Vascularization in bone tissue-engineered constructs .....	241
1.1.2. Generation of co-culture models by LAB for bone regeneration .....	242
<b>3. Clinical implications and conclusions.....</b>	<b>243</b>
<b>4. Figures.....</b>	<b>245</b>
<b>5. References .....</b>	<b>250</b>

## 1. Laser-Induced Forward Transfer for Laser-Assisted Bioprinting

### 1.1. The history of Laser-Induced Forward Transfer

The first experiments using a “Laser-Induced Forward Transfer” (LIFT) procedure were done by Bohandy *et al.* in the 1980s (Bohandy, Kim, and Adrian 1986; Bohandy *et al.* 1988) to deposit Cu and Ag over silicon and fused silica using excimer or Nd:YAG lasers. The laser pulse was focalized onto a donor substrate coated with the metal of interest and induced a vaporization of the coating. Then, the material was recondensed on a receiving substrate. LIFT was first used to transfer metals (Bohandy, Kim, and Adrian 1986) then it was extended to oxides deposits (Fogarassy *et al.* 1989). In the 2000s, LIFT was adapted to print biomolecules (Fernández-Pradas *et al.* 2004), proteins (Barron *et al.* 2004), DNA (Colina *et al.* 2005), hydrogels (Unger *et al.* 2011), cells (Barron, Spargo, and Ringeisen 2004; Hopp 2012; Auger *et al.* 1998; Lin *et al.* 2010; Ringeisen *et al.* 2004; Barron *et al.* 2004; Doraiswamy *et al.* 2006; Catros *et al.* 2011; Guillotin *et al.* 2010).

Following the pioneering experiments using LIFT, several methods have emerged, among which “Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation Direct-Writing” (MAPLE DW) and “Absorbing Film-Assisted Laser-Induced Forward Transfer » (AFA-LIFT).

MAPLE DW (Pique *et al.* 1999; Piqué *et al.* 1999; Piqué *et al.* 1999) was developed from LIFT and MAPLE in 1999 by Pique *et al.* (Piqué *et al.* 1999). MAPLE is a process inspired by the “Pulsed Laser Deposition” (PLD) method (Eason 2006) and permits to deposit thin films of molecules (notably organic/polymer materials) that cannot be processed by PLD. MAPLE consists in deposition of a material that had been mixed or dissolved in particulate form into a solvent matrix material. The solution is coated onto a substrate or frozen (to counteract the volatility of the solvent) to form a target. Then the matrix is evaporated by several laser pulses and releases the printing solution. The energy relieved by the evaporation of the matrix is propelling the material toward a



receiver substrate. Finally, the donor material is printed as a thin layer on the receiver substrate.

MAPLE-DW is a variant of MAPLE with the direct-write capabilities of LIFT. This technique is based on the use of a matrix in the donor substrate that promotes laser energy absorption and transfer (Chrissey et al. 2003; Ringeisen et al. 2004; Young et al. 2004). The matrix is homogeneously mixed to the donor material, forming a solution. This solution is coated as a thin layer on a donor slide. Then, a pulsed laser is focused through this substrate to evaporate the matrix and transfers the donor material on a receiver substrate, facing the donor substrate. MAPLE-DW allowed the printing of metals (Modi et al. 2001), organic materials (Pique et al. 1999) and biomaterials (Ringeisen et al. 2002), among which enzymes, proteins, cells and tissues (Wu et al. 2003). For cell bioprinting, the matrix can be culture medium or an adhering surface such as a hydrogel or extra-cellular matrix (Bradley R Ringeisen et al. 2004; Hopp 2012).

AFA-LIFT acronym was given by Hopp *et al.* in 2005 (Hopp et al. 2005) and it designated the same technique as "Biological Laser Printing" (Bio-LP) (Barron et al. 2004) or "Dynamic Release Layer LIFT" (DRL-LIFT) (Tolbert et al. 1993). The purpose of this technique was to avoid direct laser exposure of the donor material, thanks to an absorbing layer and to make energy conversion more efficient by limiting pulse-to-pulse variations. In the AFA-LIFT procedure, the absorbing layer is usually a thin metallic layer (50-100 nm) deposited on the donor substrate by vacuum evaporation. Metals, ceramics, polymers and liquid can be transferred without damage with AFA-LIFT. However, residual absorbing layer contamination of the deposited material can be observed if the absorbing layer is not completely evaporated by the process (Smausz et al. 2006). Using an absorbing layer with UV radiations had been experimented.

To reduce this contamination issue, a triazene polymer layer was used as an absorbing layer of UV laser in an AFA-LIFT set-up (Fardel et al. 2007; Banks et al. 2008). It was shown that this polymer-absorbing layer limited particle contamination on the receiving substrate. However, due to the low temperature of decomposition of the triazene

polymer, there are a limited number of donor materials that can be used with this absorbing layer (Nagel et al. 2007). For biomaterials printing, a metallic absorbing layer have been widely used (Catros et al. 2011; Fernández-Pradas et al. 2004; Hopp et al. 2005) and Doraiswamy *et al.* (Doraiswamy et al. 2006) have demonstrated the deposition of biomaterials with a triazene layer.

## **1.2. General and physical principles involved in Laser-Induced Forward Transfer technologies**

Laser-Induced Forward Transfer (LIFT) is a technique initially used for microelectronic applications (Baum et al. 2013; Chakraborty et al. 2007; Thomas et al. 2007). It consists in transferring an element of matter from a substrate toward another substrate thanks to a laser pulse. Using a Laser Assisted Bioprinting (LAB) set-up, the element of matter is under the liquid form and is called “bioink”.

The temporal evolution of the LIFT printing process can be observed using Time-Resolved Imaging (TRI) (Fig. 1). Various steps can be identified. At the beginning of the process, the liquid surface is deformed by a bump, which grows gradually with time. Then, the deformation collapses progressively and a jet of liquid is formed. Latter, the jet is getting longer and is becoming narrower until it breaks off into multiple droplets.

The physical principle consists in the following processes described elsewhere (Duocastella et al. 2009; Ali et al. 2014; Guillemot, Souquet, Catros, and Guillotin 2010; Young et al. 2002; Petit 2011). Briefly, the laser pulse is absorbed by the absorbing material at the donor interface, leading to the formation of a gas bubble. The bubble diameter is oscillating and growing until it reaches a maximum diameter and it deforms progressively the liquid interface. This bubble dynamic is described by the Rayleigh-Plesset equation in a finite liquid volume (Thoroddsen et al. 2009).

The internal pressure forces are gradually diminishing with the bubble expansion. With this expansion, there is no more equilibrium between internal and external forces and this leads to the bubble collapsing and the jet formation. The jet is becoming higher and

thinner and breaks off into droplets; this disruption is caused by the Rayleigh-Plateau instability.

Three different jetting regimes can be identified, depending on the laser energy and the bioink viscosity (Ali et al. 2014; Souquet 2011) (Fig. 2). In the sub-threshold regime, there is only a surface deformation and no jet is formed. This regime is encountered for low energy, high viscosity and high bioink thickness. In the jetting regime, the jet is well defined until it breaks off into droplets. This regime can be observed for intermediate values of energy, viscosity and bioink thickness. In the plume regime, a panache of liquid explodes. This regime can be observed when high pulse energy, low bioink viscosity and low bioink thickness are used.

### **1.3. Material and Methods for Laser-Assisted Bioprinting**

A LAB set-up is based on a laser beam focalized on a ribbon (donor substrate) and a receiving substrate. A typical set-up is represented in Fig 3.

Different laser pulses could be used, depending on the type of process. An absorbing layer must be used on the donor substrate when a nanosecond laser is employed in the set-up. Indeed, the formation of a cavitation bubble is needed to initiate the deposition process (Duchemin et al. 2002) and the laser intensity is not sufficient with a nanosecond pulse to create the bubble without an absorbing layer (Noack and Vogel 1999). A laser with a femtosecond pulse duration can be either used with or without the absorbing layer (Dinca et al. 2008). Moreover, the nature of the absorbing layer can lead the laser wavelength choice, if the material is more absorbent for a particulate wavelength (Souquet 2011). Furthermore, wavelengths in the near Infra-Red are often preferred over Ultra-Violet to avoid alteration of the donor material in biological properties, i.e. potential distortion of DNA under UV action (Catros et al. 2009). Various types of lasers had been used for bioprinting: KrF excimer laser for proteins deposition (248 nm, 15 ns) (Dinca et al. 2008); excimer lasers for mammalian cells deposition (193

nm, 30 ns) (Doraiswamy et al. 2006); dye laser-based femtosecond excimer laser for proteins deposition (500 fs, 248 nm) (Dinca et al. 2008); Nd:YAG laser for endothelial cells deposition (1064 nm, 30 ns) (Catros et al. 2011); quadrupled Nd:YAG laser for protein and cell deposition (266 nm, 5 ns) (J A Barron et al. 2004).

The donor substrate is usually made of quartz, as it must be transparent to the laser wavelength in order to enable the light to get through the ribbon. The donor substrate comprises a laser-absorbing layer, which is vaporized by the laser pulse, resulting in a jet of liquid bioink that is transferred on the receiving substrate. This thin absorbing layer of several dozen nanometers can be made of gold (Schultze and Wagner 1991), titanium (Guillotin et al. 2010), silver (Smausz et al. 2006) or triazene polymer (Fardel et al. 2007; Dinca et al. 2012). The metallic absorbing layer is deposited on the ribbon by a sputter coater (Hopp 2012).

The receiver substrate is usually made of quartz and it can be covered by a thin collagen layer (Chrissey et al. 2003) for cell printing experiments: this collagen layer softens the cell landing during printing and constitutes a support for cell development after printing. The laser displacement on the ribbon is controlled by galvanometric mirrors (sometimes named scanner) or stage displacement of the ribbon. The receiver substrate can also be a living tissue such as an open wound (Keriquel et al. 2010).

The bioink can be made of cells suspended into a culture medium (Lin et al. 2010), DNA (Zergioti et al. 2005), proteins (Pique 2002), or a biomaterial (Zergioti et al. 2005). Different procedures have been described to deposit the bioink onto the ribbon. A micrometric pipette can be used (Catros et al. 2011), as well as a micrometric blade coater (Ali et al. 2014) in order to spread a thin layer of several tenths of microns. Also, a tank of several hundred of microns depth can be used as a ribbon in case of LAB without absorbing layer. The laser bioink is prepared with usual chemistry tools (milligram weighing scale, milliliter pipettes, magnetic stirrer). Cell bioink is prepared under sterile conditions.

An example of laser bioprinter is the LAB workstation of BioTis research group (U1026, Inserm, Bordeaux, France). It consists of a laser driven with galvanometric mirrors, a positioning system to move the donor substrate, a dedicated software to print desired

complex patterns and to control laser printing parameters (Catros et al. 2011). The Nd:YAG laser (Navigator I, Newport Spectra Physics) has a pulse duration of 30 ns at 1064 nm for a repetition rate ranged from 1 to 100 kHz. The five-axe motorized stages system (NovaLase, SA, Canéjan, France) is composed of 3 axes dedicated to the donor substrate displacement with a resolution up to 1  $\mu\text{m}$  for x,y axis and up to 5  $\mu\text{m}$  for z axis (axis in the laser propagation direction). The 2 other axis are driven a donor carousel with an angular resolution of 1°. This carousel, allowing the use of five different donors, permits to achieve multi-color printing.

It is essential for bioprinting to control a large set of parameters, among which the laser pulse energy, the distance between donor and receiver, the bioink viscosity, the position of the focused laser beam relatively to the air/bioink interface or the bioink thickness. Indeed, the printed diameter, linked with the maximum high reached by the printing jet, can vary if these parameters are modified (Dinca et al. 2008). Also, the viability of the printed cells is altered depending on the pulse energy (Catros et al. 2011).

## **2. Applications of LAB for tissue engineering**

### **1.1. Contribution of LAB in biofabrication and tissue engineering**

Definition of bioprinting technology has been formulated as « the use of computer-aided transfer processes for patterning and assembling living and non-living materials with a prescribed 2D or 3D organization in order to produce bioengineered structures serving in regenerative medicine, pharmacology and basic cell biology studies » (Guillemot, Mironov, and Nakamura 2010). Bioprinting is certainly a shift in paradigm as compared to other available approaches of tissue engineering. Its principle is to organize the individual elements of the tissue during its fabrication through the layer-by-layer deposit of cells and biomaterials. It allows to reproduce the environment and creates a structure of precise and reproducible shape. This bottom-up approach is compatible with an automation of the procedure for tissue production and can work in a 100% sterile environment. Moreover, as tissue engineering is an expensive technology, automation

will allow reduction of costs and better quality and reproducibility of the products. Rapid prototyping can also offer solutions for quick testing of new shape or biomaterial.

Laser-Assisted Bioprinting (LAB) is based on Laser-Induced Forward Transfer technology. As exposed in section 1, the original application for LIFT was metal transfers. It was modified for its considerable potential for biological applications. It can print a large class of biological materials including peptides, DNA, biomaterials and cells, with a cell-level resolution. As opposed to ink-jet and extrusion based printers, this technique is free of orifice, allowing for printing at high cell density without risk of clogging. The control over cell density and 3D organization of the tissue will eventually contribute in engineering of more complex organ in a physiological architecture.

From a macro and micro- point of view, organ architecture is defined by the layout of cells with different functions in their individually designed extracellular matrix. They are in close interactions with each other and precisely organized in three-dimensions.

Engineering of biological tissues *in vitro* requires the use of appropriate combination of cells and biomaterials in order to mimic both cell microenvironment and tissues microarchitecture in the body. Miniaturization of tissue-engineered structures will allow for the fabrication of organotypic structures with a physiologically relevant size and a potential functionality.

During tissue development and remodeling, the local microenvironment of cells defines their behaviour and phenotype. This environment includes gradients of soluble and insoluble factors as well as physical forces. Dynamic reciprocity created between form and function is relevant to the justification of engineering a multicellular architecture reproducing a physiological histoarchitecture of human organs.

Bioprinting aims at creating three-dimensional biological structures, layer-by-layer, from the bottom. The reproduction of the microarchitecture of living tissue, first at a cell level, remains a challenge. LAB allows precise printing of different types of cells, using a high cell density and at the same time a high spatial organization. The high resolution achievable by LAB allows to respect this spatial organization and study cell-cell and

cell-material interactions. Moreover LAB offers possibilities to create gradients of printed materials to manipulate the micro-environment.

Even if reproducing the local cell micro-environment is considered as the ultimate target to obtain artificial organs and tissues, cell patterning is also very important for *in vitro* experiments. For example, Schiele *et al.* demonstrated the potential of LAB for applications in tissue engineering, studies of tumorigenesis, cancer drug screening, studies of cell differentiation, analysis of interactions between cell-cell, cell-drug and cell-biomaterial for instance (Schiele *et al.* 2010; Nathan Robert Schiele, Chrisey, and Corr 2011).

## **1.2. Bioprinting of biomaterials and cells**

In tissue engineering, laser printing technologies have been used to print viable cells with a cell-level resolution and a desired 3D architecture with the aim of mimicking the histological organization of organs.

Odde *et al.* have first reported a technique, using a near-infrared diode laser, to print embryonic chick spinal cord cells and deposit them onto a glass slide to form small patterns of cells. This deposition process was called: « laser-guided direct writing » (Odde and Renn 1999). After this first application, Wu *et al.* have developed two systems, Matrix-Assisted Pulsed-Laser Evaporation (MAPLE) and MAPLE Direct Write (MDW), to print thin layers of biomaterials (Wu *et al.* 2001).

MDW was first performed to produce patterns of proteins and *Escherichia Coli*, with a micrometric resolution (Ringeisen *et al.* 2002). These prokaryotes were the first cells to be printed with success by LIFT. They preserved their viability and functionality after printing but reproducibility and resolution were limited.

Ringeisen *et al.* demonstrated accurate dispensing of active proteins at the picoliter-scale using this laser transfer technique. Their results indicated that the active site of

proteins was not damaged by the laser process and that this system can be employed successfully to elaborate a powerful protein microarray (Ringeisen et al. 2002). The same research group showed that mammalian cells can be transferred onto hydrogel substrate by the same technique and a matrix material to absorb the laser pulse and initiate printing (Ringeisen et al. 2004). Embryonal carcinoma cell line has been printed with viability proportional to the thickness of the hydrogel on the collector slide. Modified-LIFT experiments have demonstrated high preservation of cell viability after printing. The next challenge was the creation of three-dimensional cell constructs using this printing technology (Stratakis et al. 2009).

Barron *et al.* have modified MAPLE-DW to precisely and quickly deposit mammalian cells and this novel laser-based printing technique was named « Biological laser printing » (BioLP). BioLP was used to form patterns of human osteosarcoma and rat cardiac cells, near single cell resolution, with near 100% viability. BioLP was presented as a technology allowing printing of multiple cell types, large-scale cell arrays, preliminary experiments on creating multi-layer cell constructs and finally, transfer of genetically-modified bacteria for biosensor applications. BioLP enabled smaller drop sizes, higher resolution, and increased reproducibility compared to other laser technologies (Barron et al. 2004).

Several other groups showed near 100% post-printing cell viability for different types of absorbing layers and cells (Hopp et al. 2005; Koch et al. 2009; Othon et al. 2008). Many cell types and biomaterials have been successfully printed using laser-assisted bioprinting. Chen et al. utilized BioLP to pattern bovine aortic endothelial cells (BAECs) onto a cell adherent hydrogel substrate, with near-100% viability post-printing (Chen, Barron, and Ringeisen 2006). Doraiswamy *et al.* have demonstrated deposition of hydroxyapatite, MG63 osteoblast-like cells, and extracellular matrix using MAPLE DW. Cell viability and capacity for proliferation were preserved when MG63 were codeposited with bioceramic scaffold materials (Doraiswamy et al. 2007). Lin *et al.* have studied how laser fluence impacts cell viability after printing and cell recovery ability in MAPLE DW using *Saccharomyces cerevisiae* cells. Viability of yeast cells was decreasing while increasing laser fluence and some of the MAPLE DW process-induced



cell damage was reversible (Lin et al. 2009). With regard to human primary cells, several applications and consistent types of cells have been addressed: Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC), Human Umbilical Vein Smooth Muscle Cells (HUVSMC) (Wu and Ringeisen 2010; Gaebel et al. 2011), Human Mesenchymal Stem Cells (hMSC) (Gaebel et al. 2011; Koch et al. 2009; Martin Gruene et al. 2010), Adipose-tissue Derived Stem Cells (ADSC) and Endothelial Colony-forming Cells (ECFC) (M Gruene et al. 2011) as well as bone-marrow derived osteo-progenitors (HOP) (Catros et al. 2011). This list proves the versatility of the process and the possibility to combine several types of cells to investigate cell-to-cell cooperation *in vitro*.

It is noteworthy that these cells have been systematically embedded in specific bioinks such as culture medium alone, in combination with sodium alginate, thrombine, combination of hyaluronic acid and fibrinogen, or a combination of blood plasma and sodium-alginate (M. Gruene et al. 2011). Culture medium supplemented with sodium alginate, or hydrogels like Collagen type I and Matrigel have been used as well.

Therefore, LAB gives the possibility to print patterns of biomaterials before printing cells onto the patterned biomaterial for the creation of stem cells niches. The aim of future studies may be to organize several components like cells, extracellular matrix-like materials, and growth factors at different scale of histology to analyze the behaviour of several combinations (B R Ringeisen, Wu, et al. 2002; Pique et al. 1999; Chrisey et al. 2003). This patterning of biomaterials by LAB can be used for the fabrication of 3D structures and therefore can lead to applications in regenerative medicine.

Another approach could be to combine different rapid prototyping technologies for scaffold fabrication prior to cell seeding by LAB (Pirlo et al. 2006). Combination of multiple approaches will allow a better control over tissue architecture than what can be achieved in scaffold based constructs (Schiele et al. 2009). Precise cells deposition technologies permit to control cell fate and behaviour and to guide cells at the desired site of the structure by directly insert chemical or biological factors onto substrate. This process can also permit to organize and use traction forces from cells to induce a 3D conformation of the constructs (Kuribayashi-Shigetomi, Onoe, and Takeuchi 2012).

### 1.3. Bioprinting of other biological elements, DNA and Peptides

Transmembrane proteins are major cellular components of cellular microenvironment, playing fundamental roles in the control the functions of cell adhesion and migration. Enzymes, antibodies, and membrane receptors can be printed by LIFT as spots of protein arrays. A pulsed laser beam has been used by Serra *et al.* to print droplets of the *Treponema pallidum* protein antigen on a glass slide. This single protein microarray was produced through LIFT to assess the effect of the deposition technique on protein integrity and reactivity (Serra et al. 2004).

DNA and proteins microarrays are a powerful tool in biology in areas such as genomics and proteomics. They can be used to detect variations in protein sequence and allow diagnosis, evaluation and drug development (Stratakis et al. 2009). Heterogeneous microbead patterns have been fabricated on a bead-by-bead basis to support new opportunities for development of medical sensors and actuators, biosensors, lab-on-a-chip platforms as well as cell culture systems. Indeed, LIFT is a powerful technology capable of patterning micrometer-diameter beads into predefined patterns. High-precision placement of physiologically relevant microbead subunits into patterns has demonstrated broad implication for biomedical applications (Phamduy et al. 2012). Karaïskou *et al.* have fabricated lambda phage DNA microarray, on glass substrates by LIFT. Zergioti *et al.* have developed the microprinting of DNA and proteins patterns, using ultrafast UV laser-induced forward transfer (Zergioti, 2005). They demonstrated the maintenance of their properties and biological functions and shown that they can actually be used as biosensors (Stratakis, 2009). LIFT has also been used for the transfer of salmon DNA-containing droplets. This double stranded DNA was transfer from a liquid film onto poly-L-lysine slides by means of a pulsed Nd :YAG laser (Fernández-Pradas et al. 2004). The adherence of DNA onto the substrates was demonstrated by fluorescence analyses and proved that the titanium thin film can be used as the absorbing layer. Colina *et al.* showed that the LIFT printing did not significantly damage the transferred DNA (Colina et al. 2005). They showed that

microarrays produced through LIFT are comparable to other approaches such as pin microspotting regarding intensity and stability of the signal as well as gene discrimination. Dinca *et al.* used nanosecond LIFT to generate high-density peptide arrays on modified glass surfaces (Dinca et al. 2008). Taken together, those studies established the usefulness of LIFT techniques for microarray fabrication using DNA.

#### 1.4. Intake of LAB in Three-dimensional printing strategies

Three-dimensional printing of tissue constructs *in vitro* remains a challenge. Tissue engineering for tissue repair requires the management of vascularization and histological complexity. LAB does not seem to be appropriated for building large volume constructs, since the usual volume of a droplet is around 1 pL (Guillemot et al. 2010). Nevertheless, some materials such as hydrogels and biopapers can provide volume in this layer-by-layer approach and generates larger constructs.

Nahmias *et al.* showed that human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) can be patterned in 2D and 3D with a micrometer precision using LGDW (Nahmias et al. 2005). Patterning of HUVEC on matrigel results in self-assembly of endothelial cells into vascular structures along the desired pattern. Patz *et al.* demonstrated that B35 neuronal cells can be transferred onto a polymerized Matrigel substrate using matrix-assisted pulsed laser evaporation-direct write (MDW) (Patz et al. 2006). Othon *et al.* printed olfactory ensheathing cells in 3D lines providing a favorable environment for neurite outgrowth in this original spinal cord injury models (Othon et al. 2008).

Some authors suggested to support the layer-by-layer assembly of biological components like cells and extracellular matrix with bio-papers, that provide a mechanical support and offer to the cells a specific microenvironment. Biopapers consist in thin films (few hundred microns) of solid biomaterials inserted between

successive layers of bio-printed cells. Cells are patterned within the material with respect to the diffusion limit of oxygen (200µm in living tissues), in order to prevent hypoxia. Another advantage of this method is that biopapers can limit the migration of patterns after printing.

Catros *et al.* have demonstrated that the position of the cells in a 3D construct, using a sandwich combining PCL bio-papers and osteosarcoma cell line MG63 printed onto them by LAB, had a significant effect on cell proliferation *in vitro* and *in vivo* (Catros et al. 2012). Also, Wu et al. used PLGA/hydrogel (type I collagen or matrigel) bio-papers to print HUVEC (Russell Kirk Pirlo et al. 2012). This material was stackable and might be useful for 3D printing.

Different materials can be used in combination with LAB for the generation of 3D structures, which have potential applications in biological and/or medical fields. LAB could be associated with various other tissue engineering methods.

## **1.5. In vivo bioprinting**

LAB could lead to different applications in medical fields and to innovative therapeutic solutions as *in vivo* bioprinting.

Koch *et al.* printed skin cell (fibroblasts/keratinocytes) and human mesenchymal stem cells (hMSC) using LAB because those cell types have shown a high potential in human skin regeneration (Koch et al. 2009). Collagen embedded fibroblasts and keratinocytes were 3D printed as a simple model of skin tissue. They suggested that these tissue-engineered constructs could be used for *in vivo* testing after implantation on model animal (Koch et al. 2012). To do so, Michael *et al.* have created a skin substitute by LAB. They organized fibroblasts and keratinocytes on a stabilizing matrix (Matrigel®) and implanted these skin constructs *in vivo*, in mice. They demonstrated that this LAB-produced cell construct can be remodeled *in vivo* (Michael et al. 2013). Gaebel *et al.*

prepared a cardiac patch seeded with HUVEC and hMSC in a defined pattern, using LIFT cell printing technique, for cardiac regeneration. They demonstrated feasibility of transplantation of a LAB tissue-engineered constructs *in vivo*, on the myocardial infarcted heart of a rat model (Gaebel et al. 2011). Therefore, LAB technology allows tissue regeneration, patterning of cells and promotion of vasculogenesis. It has been proposed that layer-by-layer bioprinting increases seeding efficiency in porous materials (Catros et al. 2011). The results showed that LAB permits to print and organize nHA and HOPs in 2D and 3D. They demonstrated that the layer-by-layer approach was relevant to encapsulate cells between PCL biopapers. Moreover, this method allows preservation of cell viability as well as capacity to proliferate.

LAB was used to create *in vitro* three-dimensional constructs, suggesting a second step of *in vivo* implantation. Nevertheless, another approach consists in direct *in situ* bioprinting: In the early eighties, the development of computer-assisted medical interventions (CAMIs) arises from converging evolutions of a variety of domains including physics, medicine, materials, electronics, informatics and robotics. CAMIs provide a tool that allows the clinician to use multi-modality data in a rational and quantitative way in order to plan, simulate and execute minimally invasive medical interventions more accurately and safely (Nof 2009). Rapid prototyping in regenerative medicine allow tissue engineers to precisely control scaffold structure and guide cells in the formation of a functional tissue. Bioprinting technologies have been applied to computer-assisted medical interventions for *in vivo* printing (Keriquel et al. 2010). This study aimed at filling a critical size calvarial bone defect in mouse by printing nanohydroxyapatite directly into the skull. A workstation was therefore adapted and dedicated to *in vivo* bioprinting experiments. Their results demonstrated that *in vivo* printing is possible and represents a significant advancement in computer-assisted medical interventions. This is a novel approach of bioprinting consisting in the layer-by-layer deposit of a biomaterial *in vivo* and *in situ*. There are currently several clinical applications for the regeneration of superficial organs, but future developments of the

printing set-ups and methods are needed for the *in vivo* and *in situ* regeneration of internal organs.

Increasing the resolution, for example by studying patterning at a cell-level resolution, may promote faster tissue organization such as improved vasculogenesis, which in turn supports quicker tissue formation and regeneration.

These cells can be printed onto a large variety of biomaterials alone or combined. The association of biomaterials and prevascularization by LAB could allow the fabrication of functional transplants for tissue regeneration. This technology could permit to bypass the *in vitro* construction process by printing directly on the patient to diminish contamination risks or implantation delay.

## **1.6. Example of LAB application for bone tissue engineering**

### **1.1.1. *Vascularization in bone tissue-engineered constructs***

Development of microvasculature and microcirculation is critical for bone tissue engineering (Novosel, Kleinhans, and Kluger 2011). To resolve the issue of a reduced vascular component, the reproduction of local microenvironment and the organization of cells are regarded as ultimate goals.

Due to the growing demand for vascularized constructs, a large number of research has been done to develop functional vascularized bone tissue *in vitro* (Grellier, Bordenave, and Amédée 2009). Bone formation requires an active process of angiogenesis, which involves communication between endothelial cells and osteoblastic progenitors. *In vitro* studies showed that ECs in coculture with osteoblasts are able to organize in capillary-like structures that can remain stable in culture (Grellier et al. 2009). In addition, the complexity of these structures is often confirmed by the presence of a vascular lumen

and by collagen type I expression in perivascular region, a major component of ECM (Hofmann et al. 2008).

Within the body, most cells are found no more than 100-200  $\mu\text{m}$  from a capillary, which provides diffusion of oxygen and nutrients, and waste products elimination, to support and maintain viable tissue (Folkman and Hochberg 1973). Promoting vascularization of engineered tissues is critical for supporting cell organization and maintaining tissue function.

To this aim, building 3D biological structures using bioprinting have been suggested.

Using bottom-up approach, functional microscale tissue building blocks can be assembled into 3D microscale tissue constructs. The design of microscale components combined with the capability to link them together to generate larger structures represents a promising way to build vascularized 3D constructs.

#### **1.1.2. *Generation of co-culture models by LAB for bone regeneration***

LAB is able to print all cell types and is a useful tool to create coculture models. For example, some authors developed cocultures by LAB in order to promote vascularization. Wu *et al.* fabricated branch/stem structures of HUVECs and HUVSMCs, using BioLP (Wu and Ringeisen 2010). When HUVSMCs and HUVECs are printed in close contact with each other, they develop cell-cell junctions around lumen-like structures.

The approach developed in our group, more specifically focused on bone regeneration, combines the use of osteoblastic and endothelial precursors both obtained from stem cells from apical papilla (SCAPs) and organized in a specific pattern, to promote synergy in cell differentiation and reorganization. We also associated multiple mesenchymal stem cells in coculture to analyze the spontaneous cells organization (Fig. 4).

Bone healing is a complex process precisely driven by local mechanical and chemical factors. Cytokines produced by the osteoblasts guide the recruitment of niche stem cells to promote healing. With the help of LAB, we investigated the behaviour of controlled bioprinted patterns of mesenchymal stem cells at different stage of osteoblastic differentiation to evaluate the optimal patterns for bone regeneration and the effect of cell to cell interactions before the construction of layer by layer 3D construct. For this purpose we printed specific patterns of mesenchymal cells (D1-Td Tomato) onto a monolayer of dental stem cells, the Stem Cells from Apical Papilla (SCAPs) on collagen, according to a pattern of 250 x 1000 (250  $\mu\text{m}$  between spots, 1000  $\mu\text{m}$  between segments). D1-Td are multipotent mouse bone marrow stromal precursors which can be considered as more mature than the SCAPs. Pattern evolution was followed by time-lapse imaging in order to evaluate the conservation of the pattern through time (Fig. 5) and if the presence of a monolayer of SCAPs could promote or inhibit the alignment of D1-Td.

The results indicate that it could be possible to guide the formation and growth of cellular constructs with predictable patterns without interaction of the underlying cells. The final goal will be to reproduce alveolar bone structure to improve the vascularization of graft after transplantation, and then promote bone regeneration. Indeed, the superposition of layers with such cellular architecture with different angle could lead to a better mechanical resistance and allow angiogenesis through the mimicking alveolar bone structure. For this purpose, strategies have to be developed in order to assemble several layers and elaborate tailor-made three-dimensional constructs. This could lead to the development of innovative therapeutic solutions.

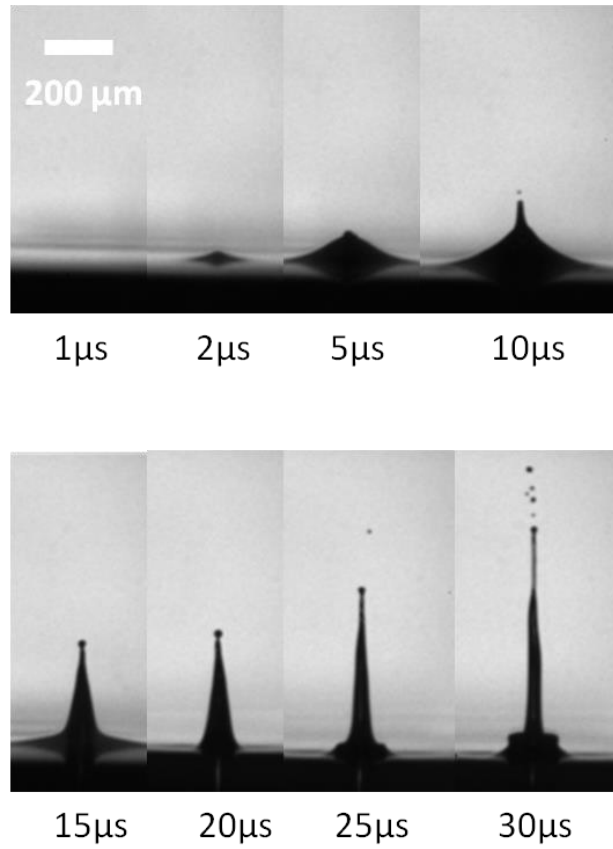
### **3. Clinical implications and conclusions**

Two major challenges in tissue engineering are mimicking final cell organization of tissues to regenerate a functional tissue and preserving viability of 3D construct thicker than 300 $\mu\text{m}$  before implantation through the process of maturation. Accurate cell bioprinting and prevascularization of engineered tissues are promising approaches that



can be both reach using LAB. Moreover LAB could lead to many different applications such as clinical use in implants, *in vitro* models, in pharmacokinetic studies, as model systems for bone-related diseases. Laser-based bioprinting techniques have been used for analyzing cellular interactions, cancer studies, tissue formation and regeneration, cell differentiation, biomaterial studies, drug screening and toxicity testing. These technologies have singular advantages for the development of *in vitro* tools but also for clinical applications. Generation of cardiac patches by LIFT for the treatment of myocardial infarction could improve wound healing and functional preservation (Gaebel et al. 2011). Additionnally, this technology has been utilized for complex tissues such as bioprinting skin with its various ECM and cellular components (Koch et al. 2012). LAB, an emerging technology in tissue engineering, allows to reproduce *in vitro* cell microenvironment by controlling shape and density of cell patterns and gradients. Combined with other tissue engineering methods, LAB technology is an innovative tool for fundamental research, tissue engineering and repair. Finally, while great progress have been made in the development of cell chips and microarrays produced by LAB, original applications will certainly arise in the following years such as automated robotics process, allowing for transition of LAB workstations from the bench to bedside.

## 4. Figures



*Fig. 1 : Experimental images of LIFT temporal evolution ( $t=0$  corresponds to the laser pulse). Focalization objective Numerical Aperture is 0.26 and the laser is an IR femtosecond laser (800 fs). The bioink is 10% glycerol (v/v) + 15 mg/ml BSA and the laser energy is 24  $\mu\text{J}$ . At 2  $\mu\text{s}$  there is a bubble formation, then until 5  $\mu\text{s}$  the bubble is growing. The bubble collapse and jet formation are occurring from 10 to 15  $\mu\text{s}$ . From 15 to 30  $\mu\text{s}$  the jet is growing until its break off into droplets at 30  $\mu\text{s}$ .*

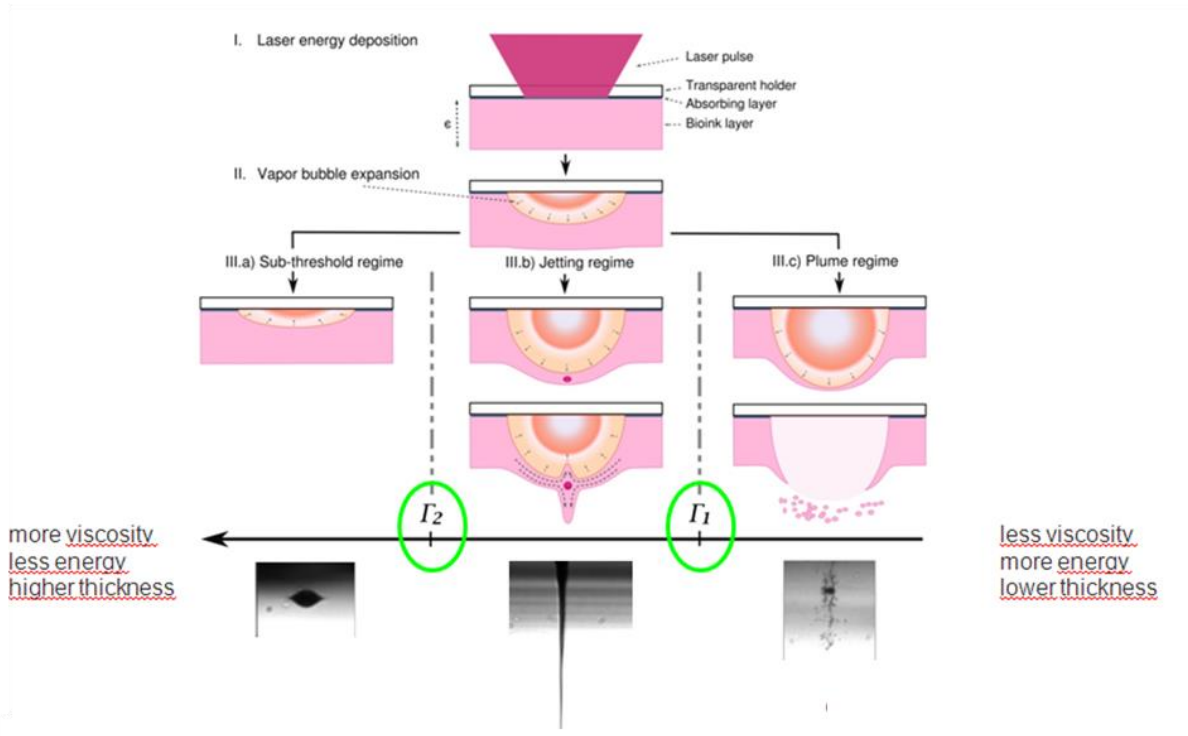
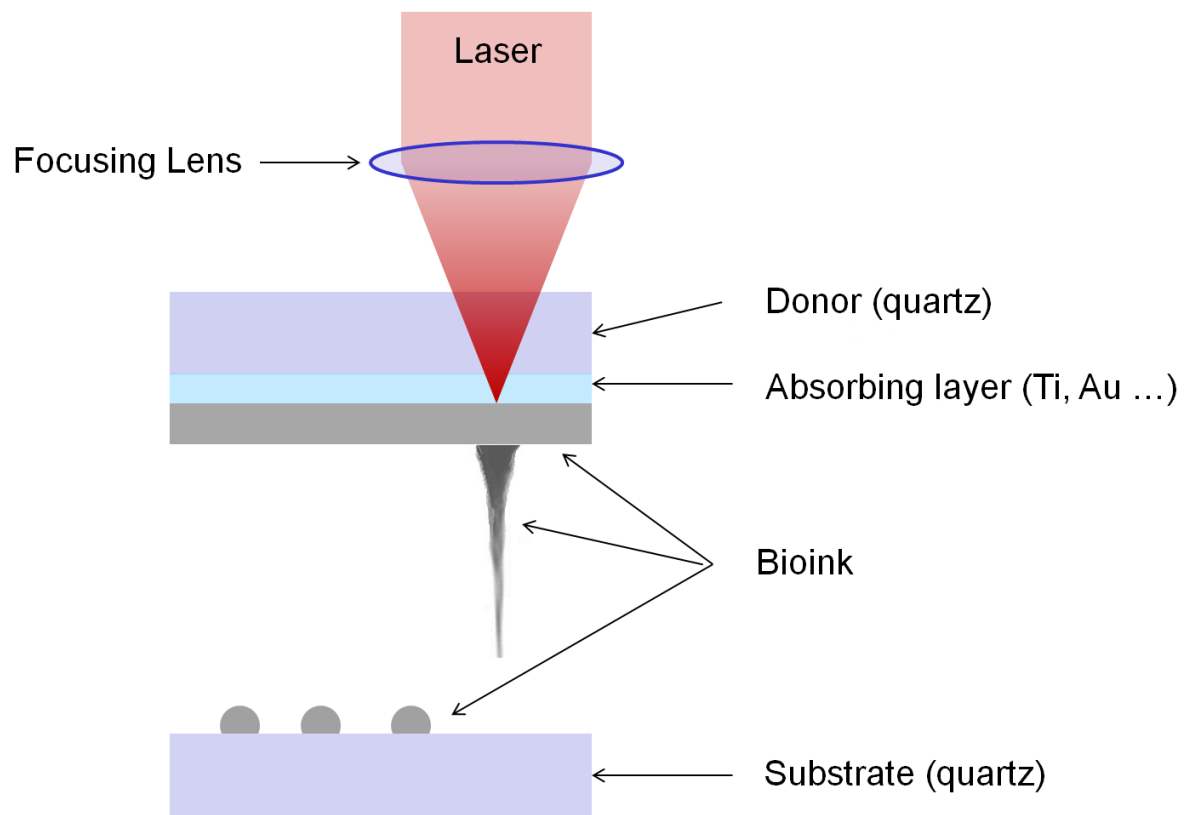
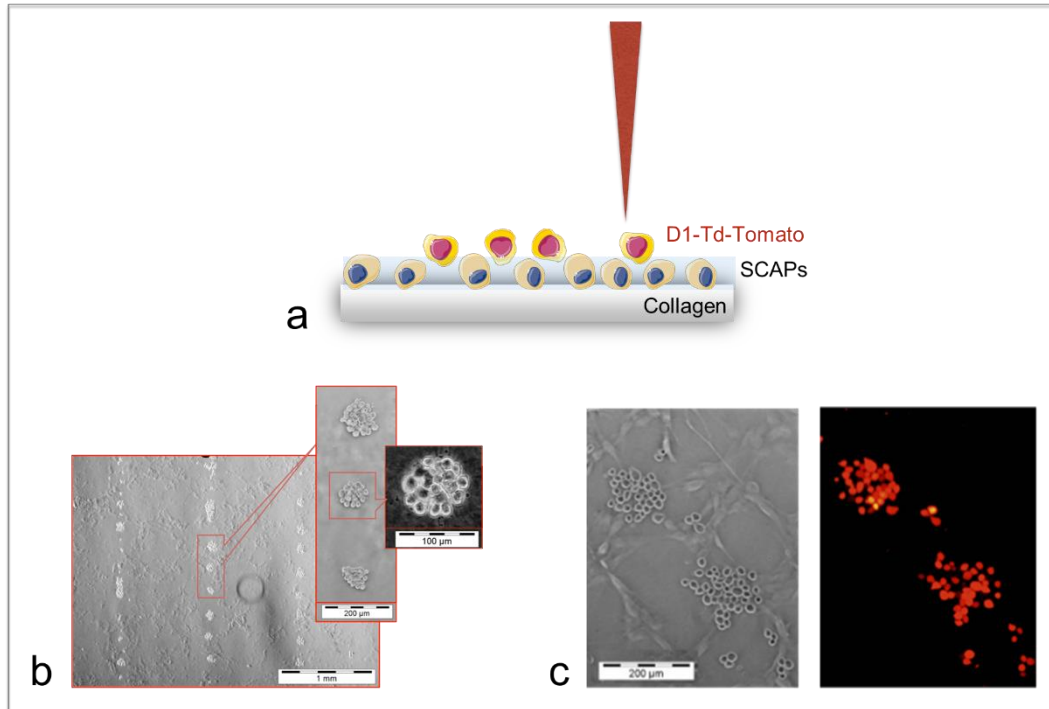


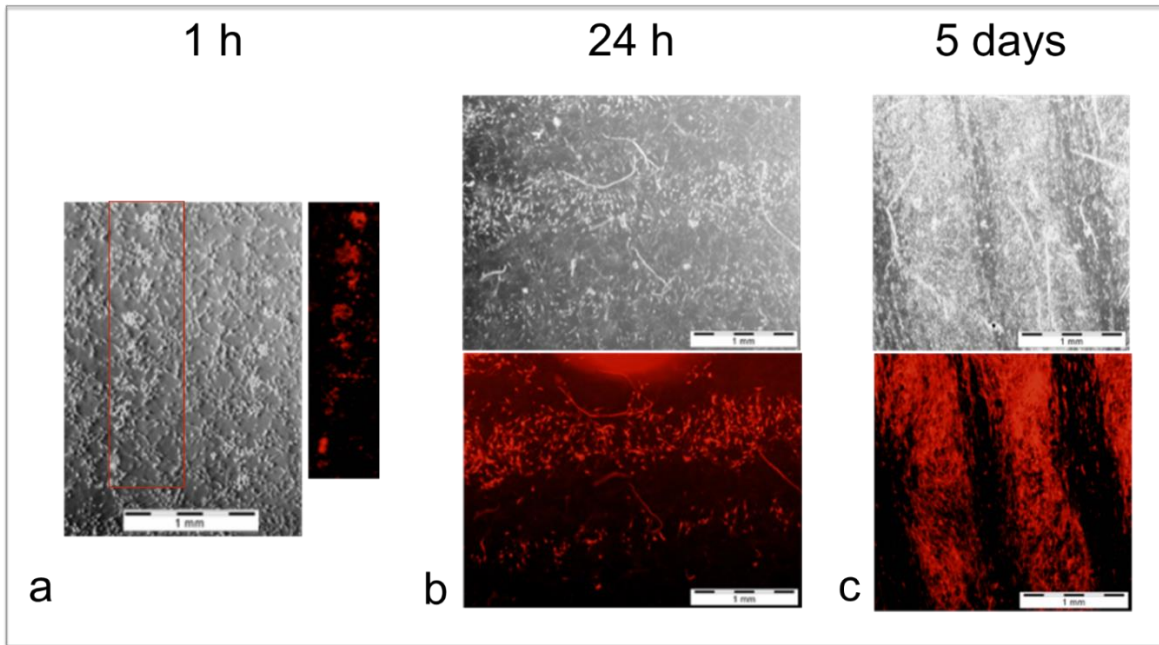
Fig. 2 : Scheme of the different LAB regimes. Scheme is extracted from Guillemot, Souquet, Catros, and Guillotin 2010.



*Fig. 3 : Laser -assisted bioprinting (LAB) set-up.*



*Fig. 4. Generation of co-culture model by LAB (a) Schematic representation of the experimentation (b) Laser printing of D1-Td-Tomato mesenchymal cells (Bioink concentration = 100 millions / mL), with a laser energy of 29µJ and a pattern 250 x 1000µm (250µm between each spot, 1000µm between each segment), featuring a concentration of 20 – 30 cells per droplet. Phase contrast microscope images of cells printed onto a monolayer of SCAPs and collagen (c) Phase contrast and fluorescence microscope images of two printed spots.*



*Fig. 5. Phase contrast and fluorescence microscope images of D1-Td-Tomato mesenchymal cells after being transferred by LAB, in co-culture with SCAPs. Preservation of printed patterns as a function of time post-printing (a) 1h (b) 24h (c) 5 days.*

## 5. References

1. Ali, Muhammad, Emeline Pages, Alexandre Ducom, Aurelien Fontaine, and Fabien Guillemot. 2014. "Controlling Laser-Induced Jet Formation for Bioprinting Mesenchymal Stem Cells with High Viability and High Resolution." *Biofabrication* 6 (4): 045001. doi:10.1088/1758-5082/6/4/045001.
2. Auger, F., M. Rouabhia, F. Goulet, F. Berthod, V. Moulin, and L. Germain. 1998. "Tissue-Engineered Human Skin Substitutes Developed from Collagen-Populated Hydrated Gels: Clinical and Fundamental Applications." *Medical and Biological Engineering and Computing* 36 (6): 801–12. doi:10.1007/BF02518887.
3. Banks, David P., Christos Grivas, Ioanna Zergioti, and Robert W. Eason. 2008. "Ballistic Laser-Assisted Solid Transfer (BLAST) from a Thin Film Precursor." *Optics Express* 16 (5): 3249. doi:10.1364/OE.16.003249.
4. Barron, Jason A., Bradley R. Ringeisen, Heungsoo Kim, Barry J. Spargo, and Douglas B. Chrisey. 2004. "Application of Laser Printing to Mammalian Cells." *Thin Solid Films*, 13, 453-454: 383–87. doi:10.1016/j.tsf.2003.11.161.
5. Barron, J.A., B.J. Spargo, and B.R. Ringeisen. 2004. "Biological Laser Printing of Three Dimensional Cellular Structures." *Applied Physics A* 79 (4-6). doi:10.1007/s00339-004-2620-3.
6. Barron, J A, P Wu, H D Ladouceur, and B R Ringeisen. 2004. "Biological Laser Printing: A Novel Technique for Creating Heterogeneous 3-Dimensional Cell Patterns." *Biomedical Microdevices* 6 (2): 139–47.
7. Baum, M., H. Kim, I. Alexeev, A. Piqué, and M. Schmidt. 2013. "Generation of Transparent Conductive Electrodes by Laser Consolidation of LIFT Printed ITO Nanoparticle Layers." *Applied Physics A* 111 (3): 799–805. doi:10.1007/s00339-013-7646-y.
8. Bohandy, J., B F Kim, and F J Adrian. Aug1986. "Metal Deposition from a Supported Metal Film Using an Excimer Laser." *J Appl Phys* 60 (4): 1538–39.
9. Bohandy, J., B. F. Kim, F. J. Adrian, and A. N. Jette. 1988. "Metal Deposition at 532 Nm Using a Laser Transfer Technique." *Journal of Applied Physics* 63 (4): 1158. doi:10.1063/1.340023.
10. Catros, Sylvain, Jean-Christophe Fricain, Bertrand Guillotin, Benjamin Pippenger, Reine Bareille, Joëlle Amédée, and Fabien Guillemot. 2009. "High-Throughput Biological Laser Printing For Bone Tissue Engineering." Oral presented at the 2nd World Termis Congress, Seul, South Korea.
11. Catros, Sylvain, Jean-Christophe Fricain, Bertrand Guillotin, Benjamin Pippenger, Reine Bareille, Murielle Remy, E Lebraud, Bernard Desbat, Joëlle Amédée, and Fabien Guillemot. 2011. "Laser-Assisted Bioprinting for Creating on-Demand Patterns of Human Osteoprogenitor Cells and Nano-Hydroxyapatite." *Biofabrication* 3 (2): 025001. doi:10.1088/1758-5082/3/2/025001.
12. Catros, Sylvain, Fabien Guillemot, Anandkumar Nandakumar, Sophia Ziane, Lorenzo Moroni, Pamela Habibovic, Clemens van Blitterswijk, et al. 2012. "Layer-by-Layer Tissue Microfabrication Supports Cell Proliferation in Vitro and in Vivo." *Tissue Engineering. Part C, Methods* 18 (1): 62–70. doi:10.1089/ten.TEC.2011.0382.
13. Catros, Sylvain, Bertrand Guillotin, Markéta Bacáková, Jean-Christophe Fricain, and Fabien Guillemot. 2011. "Effect of Laser Energy, Substrate Film Thickness and Bioink Viscosity on Viability of Endothelial Cells Printed by Laser-Assisted Bioprinting." *Applied Surface Science* 257 (12): 5142–47. doi:10.1016/j.apsusc.2010.11.049.
14. Chakraborty, S., H. Sakata, E. Yokoyama, M. Wakaki, and D. Chakravorty. 2007. "Laser-Induced Forward Transfer Technique for Maskless Patterning of Amorphous V2O5 Thin Film." *Applied Surface Science* 254 (2): 638–43. doi:10.1016/j.apsusc.2007.06.066.
15. Chen, C.Y., J.A. Barron, and B.R. Ringeisen. 2006. "Cell Patterning without Chemical Surface Modification: Cell–cell Interactions between Printed Bovine Aortic Endothelial Cells (BAEC) on a Homogeneous Cell-Adherent Hydrogel." *Applied Surface Science* 252 (24): 8641–45. doi:10.1016/j.apsusc.2005.11.088.

16. Chrisey, D. B., A. Piqué, R. A. McGill, J. S. Horwitz, B. R. Ringeisen, D. M. Bubb, and P. K. Wu. 2003. "Laser Deposition of Polymer and Biomaterial Films." *Chemical Reviews* 103 (2): 553–76. doi:10.1021/cr010428w.
17. Colina, M., P. Serra, J.M. Fernández-Pradas, L. Sevilla, and J.L. Morenza. 2005. "DNA Deposition through Laser Induced Forward Transfer." *Biosensors and Bioelectronics* 20 (8): 1638–42. doi:10.1016/j.bios.2004.08.047.
18. Dinca, V., M. Farsari, D. Kafetzopoulos, A. Popescu, M. Dinescu, and C. Fotakis. 2008. "Patterning Parameters for Biomolecules Microarrays Constructed with Nanosecond and Femtosecond UV Lasers." *Thin Solid Films*, 4, 516 (18): 6504–11. doi:10.1016/j.tsf.2008.02.043.
19. Dinca, V., A. Patrascioiu, J.M. Fernández-Pradas, J.L. Morenza, and P. Serra. 2012. "Influence of Solution Properties in the Laser Forward Transfer of Liquids." *Applied Surface Science* 258 (23): 9379–84. doi:10.1016/j.apsusc.2012.02.007.
20. Doraiswamy, A., R. J. Narayan, M. L. Harris, S. B. Qadri, R. Modi, and D. B. Chrisey. 2007. "Laser Microfabrication of Hydroxyapatite-Osteoblast-like Cell Composites." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 80A (3): 635–43. doi:10.1002/jbm.a.30969.
21. Doraiswamy, A., R.J. Narayan, T. Lippert, L. Urech, A. Wokaun, M. Nagel, B. Hopp, et al. 2006. "Excimer Laser Forward Transfer of Mammalian Cells Using a Novel Triazene Absorbing Layer." *Applied Surface Science* 252 (13): 4743–47. doi:10.1016/j.apsusc.2005.07.166.
22. Duchemin, Laurent, Stéphane Popinet, Christophe Josserand, and Stéphane Zaleski. 2002. "Jet Formation in Bubbles Bursting at a Free Surface." *Physics of Fluids* 14 (9): 3000. doi:10.1063/1.1494072.
23. Duocastella, M., J. M. Fernández-Pradas, J. L. Morenza, and P. Serra. 2009. "Time-Resolved Imaging of the Laser Forward Transfer of Liquids." *Journal of Applied Physics* 106 (8): 084907. doi:10.1063/1.3248304.
24. Eason, Robert, ed. 2006. *Pulsed Laser Deposition of Thin Films: Applications-Led Growth of Functional Materials*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.wiley.com/10.1002/0470052120>.
25. Fardel, Romain, Matthias Nagel, Frank Nüesch, Thomas Lippert, and Alexander Wokaun. 2007. "Fabrication of Organic Light-Emitting Diode Pixels by Laser-Assisted Forward Transfer." *Applied Physics Letters* 91 (6): 061103. doi:10.1063/1.2759475.
26. Fernández-Pradas, J. M., M. Colina, P. Serra, J. Domínguez, and J. L. Morenza. 2004. "Laser-Induced Forward Transfer of Biomolecules." *Thin Solid Films*, Proceedings of Symposium H on Photonic Processing of Surfaces, Thin Films and Devices, of the E-MRS 2003 Spring Conference, 453–454: 27–30. doi:10.1016/j.tsf.2003.11.154.
27. Fogarassy, E., C. Fuchs, F. Kerherve, G. Hauchecorne, and J. Perriere. 1989. "Laser-induced Forward Transfer of high-Tc YBaCuO and BiSrCaCuO Superconducting Thin Films." *Journal of Applied Physics* 66 (1): 457–59. doi:10.1063/1.344470.
28. Folkman, J, and M Hochberg. 1973. "Self-Regulation of Growth in Three Dimensions." *The Journal of Experimental Medicine* 138 (4): 745–53.
29. Gaebel, Ralf, Nan Ma, Jun Liu, Jianjun Guan, Lothar Koch, Christian Klopsch, Martin Gruene, et al. 2011. "Patterning Human Stem Cells and Endothelial Cells with Laser Printing for Cardiac Regeneration." *Biomaterials* 32 (35): 9218–30.
30. Grellier, Maritie, Pedro L. Granja, Jean-Christophe Fricain, Sílvia J. Bidarra, Martine Renard, Reine Bareille, Chantal Bourget, Joelle Amédée, and Mário A. Barbosa. 2009. "The Effect of the Co-Immobilization of Human Osteoprogenitors and Endothelial Cells within Alginate Microspheres on Mineralization in a Bone Defect." *Biomaterials* 30 (19): 3271–78. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.02.033.
31. Grellier, M., L. Bordenave, and J. Amédée. 2009. "Cell-to-Cell Communication between Osteogenic and Endothelial Lineages: Implications for Tissue Engineering." *Trends in Biotechnology* 27 (10): 562–71. doi:10.1016/j.tibtech.2009.07.001.
32. Gruene, Martin, Andrea Deiwick, Lothar Koch, Sabrina Schlie, Claudia Unger, Nicola Hofmann, Inga Bernemann, Birgit Glasmacher, and Boris Chichkov. 2010. "Laser Printing of Stem Cells for Biofabrication of Scaffold-Free Autologous Grafts." *Tissue Engineering Part C: Methods* 17 (1): 79–87. doi:10.1089/ten.tec.2010.0359.



33. Gruene, M, M Pflaum, A Deiwick, L Koch, S Schlie, C Unger, M Wilhelmi, A Haverich, and B N Chichkov. 2011. "Adipogenic Differentiation of Laser-Printed 3D Tissue Grafts Consisting of Human Adipose-Derived Stem Cells." *Biofabrication* 3 (1): 015005. doi:10.1088/1758-5082/3/1/015005.
34. Gruene, M., C. Unger, L. Koch, A. Deiwick, and B. Chichkov. 2011. "Dispensing Pico to Nanolitre of a Natural Hydrogel by Laser-Assisted Bioprinting." *Biomedical Engineering Online* 10 (1): 19.
35. Guillemot, Fabien, Vladimir Mironov, and Makoto Nakamura. 2010. "Bioprinting Is Coming of Age: Report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09)." *Biofabrication* 2 (1): 010201. doi:10.1088/1758-5082/2/1/010201.
36. Guillemot, Fabien, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, J. Lopez, M. Faucon, B. Pippenger, et al. 2010. "High-Throughput Laser Printing of Cells and Biomaterials for Tissue Engineering." *Acta Biomaterialia* 6 (7): 2494–2500. doi:10.1016/j.actbio.2009.09.029.
37. Guillemot, Fabien, Agnès Souquet, Sylvain Catros, and Bertrand Guillotin. 2010. "Laser-Assisted Cell Printing: Principle, Physical Parameters versus Cell Fate and Perspectives in Tissue Engineering." *Nanomedicine* 5 (3): 507–15. doi:10.2217/nnm.10.14.
38. Guillotin, Bertrand, Agnès Souquet, Sylvain Catros, Martí Duocastella, Benjamin Pippenger, Séverine Bellance, Reine Bareille, et al. 2010. "Laser Assisted Bioprinting of Engineered Tissue with High Cell Density and Microscale Organization." *Biomaterials* 31 (28): 7250–56. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.055.
39. Hofmann, Alexander, Ulrike Ritz, Sophie Verrier, David Eglin, Mauro Alini, Sabine Fuchs, C. James Kirkpatrick, and Pol Maria Rommens. 2008. "The Effect of Human Osteoblasts on Proliferation and Neo-Vessel Formation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells in a Long-Term 3D Co-Culture on Polyurethane Scaffolds." *Biomaterials* 29 (31): 4217–26. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.07.024.
40. Hopp, Béla. 2012. "Femtosecond Laser Printing of Living Cells Using Absorbing Film-Assisted Laser-Induced Forward Transfer." *Optical Engineering* 51 (1): 014302. doi:10.1117/1.OE.51.1.014302.
41. Hopp, Béla, Tomi Smausz, Norbert Kresz, Norbert Barna, Zsolt Bor, Lajos Kolozsvári, Douglas B Chrisey, András Szabó, and Antal Nográdi. 2005. "Survival and Proliferative Ability of Various Living Cell Types after Laser-Induced Forward Transfer." *Tissue Engineering* 11 (11-12): 1817–23. doi:32.
42. Keriquel, Virginie, Fabien Guillemot, Isabelle Arnault, Bertrand Guillotin, Sylvain Miraux, Joëlle Amédée, Jean-Christophe Fricain, and Sylvain Catros. 2010. "In Vivo Bioprinting for Computer- and Robotic-Assisted Medical Intervention: Preliminary Study in Mice." *Biofabrication* 2 (1): 014101. doi:10.1088/1758-5082/2/1/014101.
43. Koch, Lothar, Andrea Deiwick, Sabrina Schlie, Stefanie Michael, Martin Gruene, Vincent Coger, Daniela Zychlinski, et al. 2012. "Skin Tissue Generation by Laser Cell Printing." *Biotechnology and Bioengineering* 109 (7): 1855–63. doi:10.1002/bit.24455.
44. Koch, Lothar, Stefanie Kuhn, Heiko Sorg, Martin Gruene, Sabrina Schlie, Ralf Gaebel, Bianca Polchow, et al. 2009. "Laser Printing of Skin Cells and Human Stem Cells." *Tissue Engineering Part C: Methods*, December, 091221133515000. doi:10.1089/ten.tec.2009.0397.
45. Kuribayashi-Shigetomi, Kaori, Hiroaki Onoe, and Shoji Takeuchi. 2012. "Cell Origami: Self-Folding of Three-Dimensional Cell-Laden Microstructures Driven by Cell Traction Force." *PloS One* 7 (12): e51085. doi:10.1371/journal.pone.0051085.
46. Lin, Yafu, Guohui Huang, Yong Huang, Tzuen-Rong Jeremy Tzeng, and Douglas Chrisey. 2010. "Effect of Laser Fluence in Laser Assisted Direct Writing of Human Colon Cancer Cell." *Rapid Prototyping Journal* 16 (3): 202–8. doi:10.1108/13552541011034870.
47. Lin, Yafu, Yong Huang, Gaoyan Wang, Tzeng-Rong J. Tzeng, and Douglas B. Chrisey. 2009. "Effect of Laser Fluence on Yeast Cell Viability in Laser-Assisted Cell Transfer." *Journal of Applied Physics* 106 (4): 043106. doi:10.1063/1.3202388.

48. Michael, Stefanie, Heiko Sorg, Claas-Tido Peck, Lothar Koch, Andrea Deiwick, Boris Chichkov, Peter M. Vogt, and Kerstin Reimers. 2013. "Tissue Engineered Skin Substitutes Created by Laser-Assisted Bioprinting Form Skin-Like Structures in the Dorsal Skin Fold Chamber in Mice." Edited by Andrzej T. Slominski. *PLoS ONE* 8 (3): e57741. doi:10.1371/journal.pone.0057741.
49. Modi, R., H. D. Wu, R. C. Y. Auyeung, C. M. Gilmore, and D. B. Chrisey. 2001. "Direct Writing of Polymer Thick Film Resistors Using a Novel Laser Transfer Technique." *Journal of Materials Research* 16 (11): 3214–22. doi:10.1557/JMR.2001.0443.
50. Nagel, Matthias, Roland Hany, Thomas Lippert, Martin Molberg, Frank A. Nüesch, and Daniel Rentsch. 2007. "Aryltriazene Photopolymers for UV-Laser Applications: Improved Synthesis and Photodecomposition Study." *Macromolecular Chemistry and Physics* 208 (3): 277–86. doi:10.1002/macp.200600492.
51. Nahmias, Yaakov, Robert E. Schwartz, Catherine M. Verfaillie, and David J. Odde. 2005. "Laser-Guided Direct Writing for Three-Dimensional Tissue Engineering." *Biotechnology and Bioengineering* 92 (2): 129–36. doi:10.1002/bit.20585.
52. Noack, J., and A. Vogel. 1999. "Laser-Induced Plasma Formation in Water at Nanosecond to Femtosecond Time Scales: Calculation of Thresholds, Absorption Coefficients, and Energy Density." *IEEE Journal of Quantum Electronics* 35 (8): 1156–67. doi:10.1109/3.777215.
53. Nof, Shimon Y. 2009. *Springer Handbook of Automation*. Springer Science & Business Media.
54. Novosel, Esther C., Claudia Kleinhans, and Petra J. Kluger. 2011. "Vascularization Is the Key Challenge in Tissue Engineering." *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (4-5): 300–311. doi:10.1016/j.addr.2011.03.004.
55. Odde, D J, and M J Renn. 1999. "Laser-Guided Direct Writing for Applications in Biotechnology." *Trends Biotechnol* 17 (10): 385–89.
56. Othon, Christina M., Xingjia Wu, Juanita J. Anders, and Bradley R. Ringeisen. 2008. "Single-Cell Printing to Form Three-Dimensional Lines of Olfactory Ensheathing Cells." *Biomedical Materials* 3 (3): 034101.
57. Patz, T. M., A. Doraiswamy, R. J. Narayan, W. He, Y. Zhong, R. Bellamkonda, R. Modi, and D. B. Chrisey. 2006. "Three-Dimensional Direct Writing of B35 Neuronal Cells." *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 78B (1): 124–30. doi:10.1002/jbm.b.30473.
58. Petit, Julien. 2011. "Déformations et Instabilités D'interfaces Liquides Pilotées Par La Diffusion D'une Onde Laser En Milieux Turbides." Bordeaux: UNIVERSITÉ BORDEAUX 1.
59. Phamduy, Theresa B, Nurazhani Abdul Raof, Nathan R Schiele, Zijie Yan, David T Corr, Yong Huang, Yubing Xie, and Douglas B Chrisey. 2012. "Laser Direct-Write of Single Microbeads into Spatially-Ordered Patterns." *Biofabrication* 4 (2): 025006. doi:10.1088/1758-5082/4/2/025006.
60. Piqué, A., D. B. Kohn, Auyeung, R.C.Y, J. Fitz-Gerald, H. D. Wu, R. A McGill, S. Lakeou, V. Nguyen, and M. Duignan. 1999. "A Novel Laser Transfer Process for Direct Writing of Electronic and Sensor Materials." *Applied Physics A: Materials Science & Processing* 69 (7): S279–84.
61. Pique, Alberto. 2002. "Direct-Write of Sensor Devices by a Laser Forward Transfer Technique." In *Proceedings of SPIE*, 361–68. San Jose, CA, USA. doi:10.1117/12.470642.
62. Pique, Alberto, Douglas B. Chrisey, Raymond C. Y. Auyeung, Samuel Lakeou, Russell Chung, Robert A. McGill, P. K. Wu, Michael T. Duignan, J. M. Fitz-Gerald, and H. D. Wu. 1999. "Laser Direct Writing of Circuit Elements and Sensors." In , edited by Jan J. Dubowski, Henry Helvajian, Ernst-Wolfgang Kreutz, and Koji Sugioka, 330–39. doi:10.1117/12.352695.
63. Piqué, A., R.A. McGill, D.B. Chrisey, D. Leonhardt, T.E. Mslna, B.J. Spargo, J.H. Callahan, R.W. Vachet, R. Chung, and M.A. Bucaro. 1999. "Growth of Organic Thin Films by the Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation (MAPLE) Technique." *Thin Solid Films* 355-356 (November): 536–41. doi:10.1016/S0257-8972(99)00376-X.
64. Pirlo, Russell K., Delphine M. D. Dean, Daniel R. Knapp, and Bruce Z. Gao. 2006. "Cell Deposition System Based on Laser Guidance." *Biotechnology Journal* 1 (9): 1007–13. doi:10.1002/biot.200600127.

65. Pirlo, Russell Kirk, Peter Wu, Jinny Liu, and Bradley Ringeisen. 2012. "PLGA/hydrogel Biopapers as a Stackable Substrate for Printing HUVEC Networks via BioLP." *Biotechnology and Bioengineering* 109 (1): 262–73. doi:10.1002/bit.23295.
66. Ringeisen, Bradley R, Heungsoo Kim, Jason A Barron, David B Krizman, Douglas B Chrisey, Shawna Jackman, R. Y.C Auyeung, and Barry J Spargo. 2004. "Laser Printing of Pluripotent Embryonal Carcinoma Cells." *Tissue Engineering* 10 (3-4): 483–91.
67. Ringeisen, B R, D B Chrisey, A Piqué, H D Young, J Jones-Meehan, R Modi, M Bucaro, and B J Spargo. 2002. "Generation of Mesoscopic Patterns of Viable Escherichia Coli by Ambient Laser Transfer." *Biomaterials* 23 (1): 161–66.
68. Ringeisen, B R, P K Wu, H Kim, A Piqué, R Y C Auyeung, H D Young, D B Chrisey, and D B Krizman. 2002. "Picoliter-Scale Protein Microarrays by Laser Direct Write." *Biotechnology Progress* 18 (5): 1126–29. doi:10.1021/bp015516g.
69. Schiele, Nathan R, David T Corr, Yong Huang, Nurazhani Abdul Raof, Yubing Xie, and Douglas B Chrisey. 2010. "Laser-Based Direct-Write Techniques for Cell Printing." *Biofabrication* 2 (3): 032001. doi:10.1088/1758-5082/2/3/032001.
70. Schiele, Nathan R., Ryan A. Koppes, David T. Corr, Karen S. Ellison, Deanna M. Thompson, Lee A. Ligon, Thomas K.M. Lippert, and Douglas B. Chrisey. 2009. "Laser Direct Writing of Combinatorial Libraries of Idealized Cellular Constructs: Biomedical Applications." *Applied Surface Science* 255 (10): 5444–47. doi:10.1016/j.apsusc.2008.10.054.
71. Schiele, Nathan Robert, Douglas B. Chrisey, and David Thomas Corr. 2011. "Gelatin-Based Laser Direct-Write Technique for the Precise Spatial Patterning of Cells." *Tissue Engineering Part C: Methods* 17 (3): 289–98. doi:10.1089/ten.TEC.2010.0442.
72. Schultze, V., and M. Wagner. 1991. "Laser-Induced Forward Transfer of Aluminium." *Applied Surface Science* 52 (4): 303–9. doi:10.1016/0169-4332(91)90072-R.
73. Serra, P., J.M. Fernandez-Pradas, F.X. Berthet, M. Colina, J. Elvira, and J.L. Morenza. 2004. "Laser Direct Writing of Biomolecule Microarrays." *Applied Physics A* 79 (4-6). doi:10.1007/s00339-004-2577-2.
74. Smausz, T., B. Hopp, G. Kecskeméti, and Z. Bor. 2006. "Study on Metal Microparticle Content of the Material Transferred with Absorbing Film Assisted Laser Induced Forward Transfer When Using Silver Absorbing Layer." *Applied Surface Science* 252 (13): 4738–42. doi:10.1016/j.apsusc.2005.07.115.
75. Souquet, Agnès. 2011. *Etude Des Processus Physiques Mis En Jeu Lors de La Microimpression D'éléments Biologiques Assistée Par Laser*. Bordeaux 1. <http://www.theses.fr/2011BOR14232>.
76. Stratakis, E., A. Ranella, M. Farsari, and C. Fotakis. 2009. "Laser-Based Micro/nanoengineering for Biological Applications." *Progress in Quantum Electronics* 33 (5): 127–63. doi:10.1016/j.pquantelec.2009.06.001.
77. Thomas, Benjamin, Anne Patricia Alloncle, Philippe Delaporte, Marc Sentis, Sébastien Sanaur, Michael Barret, and Philippe Collot. 2007. "Experimental Investigations of Laser-Induced Forward Transfer Process of Organic Thin Films." *Applied Surface Science* 254 (4): 1206–10. doi:10.1016/j.apsusc.2007.09.042.
78. Thoroddsen, S. T., K. Takehara, T. G. Etoh, and C.-D. Ohi. 2009. "Spray and Microjets Produced by Focusing a Laser Pulse into a Hemispherical Drop." *Physics of Fluids* 21 (11): 112101. doi:10.1063/1.3253394.
79. Tolbert, W. A., I.-Y. Sandy Lee, M. M. Doxtader, E. W. Ellis, and D. D. Dlott. 1993. "High-Speed Color Imaging by Laser Ablation Transfer with a Dynamic Release Layer: Fundamental Mechanisms." *The Journal of Imaging Science and Technology* 37 (4): 411–21.
80. Unger, Claudia, Martin Gruene, Lothar Koch, Juergen Koch, and Boris N. Chichkov. 2011. "Time-Resolved Imaging of Hydrogel Printing via Laser-Induced Forward Transfer." *Applied Physics A* 103 (2): 271–77. doi:10.1007/s00339-010-6030-4.
81. Wu, P K, and B R Ringeisen. 2010. "Development of Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC) and Human Umbilical Vein Smooth Muscle Cell (HUVSMC) Branch/stem Structures on Hydrogel Layers via Biological Laser Printing (BioLP)." *Biofabrication* 2 (1): 014111. doi:10.1088/1758-5082/2/1/014111.

82. Wu, P. K, B. R Ringeisen, J Callahan, M Brooks, D. M Bubb, H. D Wu, A Piqué, B Spargo, R. A McGill, and D. B Chrisey. 2001. "The Deposition, Structure, Pattern Deposition, and Activity of Biomaterial Thin-Films by Matrix-Assisted Pulsed-Laser Evaporation (MAPLE) and MAPLE Direct Write." *Thin Solid Films* 398–399 (November): 607–14. doi:10.1016/S0040-6090(01)01347-5.
83. Wu, P. K., B. R. Ringeisen, D. B. Krizman, C. G. Frondoza, M. Brooks, D. M. Bubb, R. C. Y. Auyeung, et al. 2003. "Laser Transfer of Biomaterials: Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation (MAPLE) and MAPLE Direct Write." *Review of Scientific Instruments* 74 (4): 2546. doi:10.1063/1.1544081.
84. Young, D., R. C. Y. Auyeung, A. Piqué, D. B. Chrisey, and Dana D. Dlott. 2002. "Plume and Jetting Regimes in a Laser Based Forward Transfer Process as Observed by Time-Resolved Optical Microscopy." *Applied Surface Science* 197-198 (September): 181–87. doi:10.1016/S0169-4332(02)00322-7.
85. Young HD, Auyeung R C Y, Chrisey D B, and Dlott D D. 2004. Jetting behavior in the laser forward transfer of rheological systems, issued 2004.
86. Zergioti, I., A. Karaiskou, D.G. Papazoglou, C. Fotakis, M. Kapsetaki, and D. Kafetzopoulos. 2005. "Time Resolved Schlieren Study of Sub-Picosecond and Nanosecond Laser Transfer of Biomaterials." *Applied Surface Science* 247 (1-4): 584–89. doi:10.1016/j.apsusc.2005.01.127.

